

3. STATUSSEMINAR

CHEMIKALIEN IN DER UMWELT MIT WIRKUNG AUF DAS ENDOKRINE SYSTEM

Wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung
und Regulierung

Berlin, Donnerstag, 2. Juni 2005



3. Statusseminar

Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System

Wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung und Regulierung

Harnack-Haus, Berlin

2. Juni 2005

Veranstalter

Umweltbundesamt, Wörlitzer Platz 1, 06844 Dessau

Organisationskomitee

Dr. Andreas Gies, Umweltbundesamt

Marianne Rappolder, Umweltbundesamt

Dr. Andrea Wenzel, Fraunhofer IME

Dr. Christoph Schäfers, Fraunhofer IME

Herausgeber

Umweltbundesamt
www.umweltbundesamt.de

Redaktion

Dr. Andrea Wenzel, Marianne Rappolder, Dr. Barbara Werschkun

Kontakt

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie
Auf dem Aberg 1, 57377 Schmallenberg
Dr. Andrea Wenzel; Tel: 02972/302-329
E-mail: andrea.wenzel@ime.fraunhofer.de
www.ime.fraunhofer.de

Für die wissenschaftlichen Beiträge sind die Autoren verantwortlich.

ISBN 3-8167-6968-3

Alle Rechte vorbehalten

© by Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart 2005
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB
Postfach 80 04 69, 70504 Stuttgart
irb@irb.fraunhofer.de
www.irb.fraunhofer.de

Layout und Satz: Fraunhofer IME/Fraunhofer IRB
Titelfotos (von links nach rechts): Fraunhofer IME, Planula, MEV-Verlag
Druck: Fraunhofer IRB Mediendienstleistungen des Fraunhofer IRB, Stuttgart

INHALT	Seite
Einleitung	5
Zusammenfassung der Diskussion	6
Introduction	11
Summarized discussion	12
Einführung <i>K.-G. Steinhäuser</i>	17
WIRKUNG AUF UMWELTORGANISMEN UND MENSCHLICHE GESUNDHEIT. SPEZIELLE PROBLEME: NIEDRIG-DOSEN UND MISCHUNGEN	
Bisphenol A als Xeno-Östrogen bei Vorderkiemerschnecken <i>J. Oehlmann, U. Schulte-Oehlmann, J. Bachmann, M. Duft, M. Oetken, I. Lutz, W. Kloas, T.A. Ternes</i>	19
Testverfahren bei Amphibien zum Nachweis von endocrine disruptors (ED) mit Wirkungen auf die Reproduktion und das Schilddrüsensystem <i>W. Kloas, C. Bögi, A. Gaete, O. Jagnytsch, A. Krüger, G. Levy, C. Lorenz, N. Neumann, R. Opitz, C. Pietsch, W. Schumacher, A. Tillack, A. Trubiroha, R. Urbatzka, C. Van Ballegooy, C. Wiedemann, S. Würtz, I. Lutz</i>	38
Are there risks from low dose mixture effects of endocrine disrupters? <i>A. Kortenkamp, E. Silva, N. Rajapakse, M. Scholze</i>	48
Quae nocent, docent: Vergleichende Untersuchung zur Wirkung endokriner Disruptoren im Tierreich <i>U. Schulte-Oehlmann, J. Bachmann, D. Candia Carnevali, G. Janer, S. Jobling, W. Kloas, O. Kusk, R. Lavado, I. Lutz, C. Porte, M. Sugni, B. Watermann L. Wollenberger, J. Oehlmann</i>	64
Neue Ergebnisse aus epidemiologischen Studien zur Fortpflanzungs- gesundheit des Menschen <i>D. Pallapies</i>	74
EU Studie über die Ejakulatqualität junger Männer in Hamburg und Leipzig <i>A. Salzbrunn, U. Paasch, P. Koch, D. Flesch-Janys, H.-J. Glander, W. Schulze</i>	81
Effekte im Niedrigdosisbereich-eine Herausforderung für die Risikobewertung von Chemikalien? <i>I. Chahoud</i>	85

TESTEN UND BEWERTEN

Aktivitäten der VMGeco im OECD Test Guidelines Programme (Fische, Amphibien, Vögel, Wirbellose) <i>H.-C. Stolzenberg, B. Werschkun</i>	89
In vitro-Tests zur Prüfung potenziell endokriner Wirkungen von chemischen Verbindungen: Die Arbeit der „Validation Management Group – Non-animal Assays“ bei der OECD <i>H. Seibert</i>	94
Aktivitäten der „Validation Management Group – Mammalian Assays“ im OECD Test Guidelines Programme <i>W. Lichtensteiger</i>	97
Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System - Von der Testung zur Bewertung in der Toxikologie <i>G. Stropp</i>	99
Testen und Bewerten - eine Teststrategie für Fische <i>C. Schäfers, M. Teigeler</i>	105
Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System - Von der Testung zur Bewertung in der Ökotoxikologie <i>K. Radke, S. Zok</i>	116
TEILNEHMERLISTE	125

Einleitung

Am 2. Juni 2005 lud das Umweltbundesamt zum 3. Statusseminar „Umwelthormone – Wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung und Regulierung“ ein. Es nahmen 102 Fachleute aus Behörden, Universitäten, Industrie, Forschungsinstituten und Nicht-Regierungsorganisationen teil.

Im Zusammenhang mit der europäischen Strategie für Umwelt und Gesundheit sollte während des Statusseminars herausgearbeitet werden, welche Schritte notwendig sind, um aus den wissenschaftlichen Erkenntnissen Prüf- und Bewertungsstrategien zu entwickeln, die als Grundlage für weitere Empfehlungen und Maßnahmen dienen können. Dafür sollten Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen aus der Forschung und von Regulierungsbehörden gemeinsam die bereits vorliegenden und noch benötigten experimentellen und theoretischen Arbeiten diskutieren.

Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen (SRU) hatte in seinem Umweltgutachten 2004 darauf hingewiesen, dass es zu den hormonähnlichen Wirkungen von Umweltchemikalien verstärkter Forschung und Regulation bedürfe, da für eine stetig wachsende Zahl von Chemikalien endokrine Wirkpotentiale nachgewiesen würden. Diese Problematik war in den letzten Jahren bereits in verschiedenen Forschungsvorhaben bearbeitet worden, die das Umweltbundesamt gefördert hatte. Daher bot es sich an, mit einem 3. Statusseminar den Austausch neuer Forschungsergebnisse und die Erarbeitung eines gemeinsamen aktuellen Wissensstandes zu ermöglichen. Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei die Entwicklung von validierten Testmethoden sowie von Prüf- und Bewertungsstrategien für die Beurteilung langfristiger Auswirkungen auf Ökosysteme. Mit Hilfe solcher Methoden sollen Einzelstoffe für eine abschließende Risikobewertung im Rahmen der Gesetzesvollzüge routinemäßig auf Interaktionen mit dem Hormonsystem geprüft werden können.

Die Präsentationen behandelten im ersten Themenblock Auswirkungen auf Umweltorganismen und die menschliche Gesundheit. Schwerpunkte waren Wirkungen im Niedrigdosis-Bereich, Effekte von Mischungen sowie epidemiologische Studien zur Fortpflanzungsgesundheit des Menschen.

In einem zweiten Block widmete sich die Veranstaltung möglichen Testverfahren zur Identifikation der Effekte auf das endokrine System von Vertebraten und Invertebraten sowie der Frage nach einer geeigneten Prüf- und Bewertungsstrategie.

Zusammenfassung der Diskussionen

Die Fragen und Anmerkungen im Anschluss an die einzelnen Präsentationen sowie in der Abschlussdiskussion konzentrierten sich auf folgende Themenfelder:

- Entwicklung von Testmethoden
- Test- und Bewertungsstrategie
- Exposition
- Grundlagenforschung

Entwicklung von Testmethoden

In Anbetracht der neuen EU-Chemikalienpolitik mit der geplanten REACH Gesetzgebung stellt sich die Frage, ob mit den derzeit zur Verfügung stehenden Testmethoden Stoffe identifiziert und bewertet werden können, die unter REACH wegen ihres endokrinen Potentials als besonders besorgniserregende Stoffe im Zulassungsverfahren behandelt werden sollten. Benötigt werden Verfahren, die nach OECD-Kriterien validiert sind und als OECD-Richtlinie vorliegen, die aber auch möglichst einfach und preiswert sein sollten. Um das weitere Vorgehen in einer Teststrategie steuern zu können, müssen die Testverfahren über einen Indikatorrest hinausgehen und vor allem auch quantitative Aussagen ermöglichen.

In der folgenden Diskussion wurde hervorgehoben, dass die Mehrzahl der bisher etablierten, validen und robusten Testverfahren, sowohl zur Toxikologie als auch zur Ökotoxikologie, oft nicht geeignet sind, endokrine Effekte zu erfassen, da sie - mit Ausnahme der Reproduktionsstudien - nur für die Erfassung systemischer Toxizität entwickelt wurden.

Hinsichtlich der Testverfahren zur Säugetiertoxizität wurde diskutiert, dass das bestehende Dosierungsschema nicht geeignet erscheint, um Effekte im Niedrig-Dosis-Bereich zu erfassen. Zur Erhöhung der Aussagekraft sollten die Tests im niedrigen Dosisbereich und nicht an adulten Individuen durchgeführt werden. Es wurde vorgeschlagen, die Testvorschriften dahingehend zu überprüfen und darauf einzuwirken, dass sie entsprechend geändert werden.

Im Bericht aus der OECD Validation Management Group „Non-Animal Assays“ wurde deutlich, dass dort Japan und USA das größte Engagement zeigen. Rezeptorbindungstests sind als relativ preiswerte und schnelle Screeningtests für mechanistische Informationen gut eingeführt. Dennoch ist auch Zurückhaltung zu beobachten, da in der Vergangenheit *in-vitro* Tests oft Erwartungen nicht erfüllt haben (zu unempfindlich, zu unspezifisch). Wichtig im Umgang mit den Ergebnissen der *in-vitro* Tests ist vor allem eine kritische Einschätzung ihrer Aussagekraft im Hinblick auf lebende Organismen und ihres Stellenwertes im Rahmen einer mehrstufigen Gefährdungsabschätzung.

In der Ökotoxikologie besteht, neben der Weiterentwicklung und Validierung von Testverfahren mit Wirbeltieren, ein großer Bedarf an Untersuchungsverfahren mit anderen potentiell gefährdeten Organismusgruppen. Dazu gehören die Invertebraten-Gruppen der Mollusken, Anneliden und Arthropoden, die sich in ihrer endokrinen Steuerung sowohl deutlich von Vertebraten als auch untereinander unterscheiden können. Hier sind noch weitere, auch grundlegende Arbeiten notwendig. In der OECD Validation Management Group „Ecotoxicology“ werden zurzeit für die Gruppe der Invertebraten nur 3 Arthropodenspezies

behandelt (davon 2 marine Spezies). In der Diskussion wurde betont, dass Untersuchungen mit Invertebraten-Spezies auch als Screeningtest wünschenswert wären. Generell wurde hervorgehoben, dass es bei der Entwicklung neuer Tests wichtig sei, auf relevante und möglichst prädiktive Endpunkte zu achten, die eine mögliche Gefährdung sowohl des einzelnen Organismus als auch des Ökosystems erkennen lassen.

Test- und Bewertungsstrategie

Unerlässliche Voraussetzung für eine regulatorische Gefährdungs- und Risikoabschätzung ist eine konzeptionell schlüssige Teststrategie. In der Vergangenheit wurden z.T. Effekte von Stoffen übersehen, weil die Teststrategie für die jeweilige Fragestellung ungeeignet war.

In der Diskussion wurde deutlich, dass eine konzeptionell schlüssige Teststrategie zur Identifizierung und Quantifizierung endokriner Wirkungen derzeit nicht verfügbar ist. Eine derartige Teststrategie sollte sich einerseits möglichst eng an praktischen Fortschritten bei der Entwicklung und Validierung bestimmter Testmethoden orientieren und andererseits auf einem klaren, wissenschaftlich begründeten Bewertungskonzept beruhen. Mit einer iterativen Vorgehensweise müssen die Fortschritte der praktischen Entwicklungs- und Validierungsarbeiten und das Bewertungskonzept kontinuierlich aufeinander abgestimmt werden. Auf diesem Weg lässt sich möglicherweise auch der Bedarf an noch zu entwickelnden Tests präziser ableiten als bisher.

Im Vordergrund der Diskussion stand die Frage nach geeigneten Indikatortests bzw. Informationen für die Eingangsstufe der Teststrategie. Das Potential einer Substanz, endokrine Prozesse zu stören, muss identifizierbar oder negierbar sein. Während dabei notfalls falsch positive Ergebnisse akzeptiert werden könnten (wie z.B. bei [Q]SAR Abschätzungen), müssen falsch negative Ergebnisse sicher ausgeschlossen werden. Problematisch sind vor allem Substanzen, über die nur wenige Wirkdaten vorliegen, die wiederum keine Hinweise auf endokrines Potential liefern. Dieser Mangel an Informationen kann keinen Ausschluss von weiterer Betrachtung und Prüfung begründen. Ein Vorschlag des VCI, Verdachtsstoffe anhand bestehender Klassifizierung und Kennzeichnung zu identifizieren (z.B. R-Sätze zur Reproduktionstoxizität) wurde als unzureichend angesehen, da viele Stoffe nicht entsprechend eingestuft sind. So waren von den Stoffen der BKH-Verdachtsliste (BKH 2000, 2002) nur ca. 2 % der Stoffe mit entsprechenden R-Sätzen versehen.

In Anbetracht der hohen Zahl zu überprüfender Substanzen sind als Indikatortests einfache, schnelle Tests, theoretische Abschätzungen (QSARs) und/oder integrative *in-vivo* Tests sinnvoll, letztere besonders dann, wenn in einem Modell verschiedene Wirkmechanismen erfasst werden können („multimodal model“). Allerdings erscheint aufgrund der hohen Zahl an Stoffen, für die Eingangsinformationen erhoben werden müssen, eine *in-vivo* Überprüfung aller Stoffe kaum durchführbar. Eine Beschränkung auf *in-vitro* Tests birgt dagegen durch die große Vielzahl möglicher Mechanismen und die vergleichsweise beschränkte Auswahl an mechanistischen Tests die Gefahr des Nichterkennens endokrinen Potentials (z.B. erfassen Tests mit Androgen- oder Östrogenrezeptoren weder eine Beeinflussung des Schilddrüsensystems noch endokrine Wirkungen, die nicht Rezeptorvermittelt sind). Es wurde betont, dass daher eine fundierte Auswertung aller verfügbaren Informationen essentiell sei, um über Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen eine ge-

zielte Teststrategie für die jeweilige Substanz verfolgen zu können¹, die dann gleich bei *in-vivo* Tests einsteigen könnte.

Als Eingangstest für östrogenes Potential wurde diskutiert, anstelle des derzeit favorisierten uterotrophen Tests alternativ einen *in-vitro* Test zu verwenden, da falsch negative Befunde bisher eher in den uterotrophen als in den *in-vitro* Tests erhalten wurden. Als mehrstufige Teststrategie wurde vorgeschlagen, positive *in-vitro* Befunde durch den uterotrophen Test zu bestätigen, der dann zu einer 2-Generationenstudie bei Säugern bzw. entsprechenden Studien bei anderen Vertebraten weiterleiten würde.

Die Diskussion um einfache, relevante Wirbeltiertests führte zu der Problematik der unterschiedlichen Empfindlichkeiten der potentiell geeigneten Testspezies. Bezüglich der Daten, die auf eine höhere Sensitivität von Fischen im Vergleich zu Amphibien hindeuten, wurde darauf hingewiesen, dass die Amphibientests bisher in statischen Systemen durchgeführt wurden und eine Testung in Durchflusssystemen mit konstanten Expositionskonzentrationen, wie sie bei Fischen häufig durchgeführt wird, voraussichtlich zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit bei Amphibien führen würde.

Als besonderes Problem wurde hervorgehoben, dass kein Test die besorgniserregenden Humaneffekte wie Hodenkrebs, Brustkrebs etc. abbildet. Hierfür sind neue Testverfahren mit relevanten Parametern essentiell. Von den bestehenden Testmethoden sind allein Reproduktionsstudien geeignet, endokrine Wirkungen anzuzeigen. Da diese aber bei der Bewertung von Industriechemikalien, wenn überhaupt, erst ab einer relativ späten Phase der Teststrategie gefordert sind, ist es nach der heutigen Vorgehensweise möglich, dass hormonell aktive Substanzen als unbedenklich eingestuft werden. Als Beispiel wurde DEHP aufgeführt, dessen endokrine Wirkung (Hodentoxizität) erst im 1-Generationentest auffiel, nachdem zuvor aus der 90-Tage-Studie zur Langzeittoxizität ein im Nachhinein zu hoch liegender NOEL abgeleitet worden war.

Eine Expositionsabschätzung als alleiniges Eingangskriterium für eine Prüfung auf endokrine Wirksamkeit wurde als zu einseitig angesehen.

Exposition

In den vorgestellten epidemiologischen Studien war die Rolle endokrin wirksamer Substanzen bei der Entstehung der beobachteten Gesundheitsstörungen nicht klar erkennbar. Generell ist kaum von monokausalen, sondern eher von multiplen Abhängigkeiten auszugehen. Als sinnvoll und wünschenswert wurden Untersuchungen auf Fremdstoffe (z.B. PBDE, HCB oder Phthalate) im Ejakulat oder Blut der Probanden und im Blut der Mütter sowie des entsprechenden Umfeldes angesehen oder Erhebungen, die eine retrospektive Beurteilung der Exposition erlauben. In der EU-Studie über die Ejakulatqualität junger Männer liegen Befragungsbögen der Mütter zur Exposition während der Schwangerschaft und der ersten Lebensjahre der Söhne sowie Blut- und Ejakulatproben der Probanden vor. Die Auswertungen und Analysen werden zurzeit durchgeführt, wenn auch zusätzliche Schadstoffanalytik im Moment mangels finanzieller Mittel nicht möglich ist.

¹ Derartige Informationen liegen für Pflanzenschutzmittel, Biozide, Arzneimittel und HPV-Chemikalien mehr oder weniger ausführlich vor.

Diskutiert wurde auch, welche Parameter zur Beurteilung der Fertilität überhaupt relevant seien. Es ist zurzeit noch offen, für welchen Wertebereich einzelner physiologischer Parameter noch eine ungestörte Reproduktionsfähigkeit gegeben ist. Auch die von der WHO veröffentlichten Werte zur Spermienqualität stellen Referenzwerte und keine Richtwerte dar.

Es wurde betont, dass viele endokrine Effekte, die unter Freilandbedingungen in Umweltorganismen beobachtet wurden, nicht mit analytisch-chemischen Daten erklärt werden können. Der Suche nach unentdeckten endokrin wirksamen Stoffen kommt damit eine große Bedeutung zu.

Grundlagenforschung

Neben der Entwicklung und Validierung von Testverfahren, zusammen mit einer adäquaten Test- und Bewertungsstrategie, sollte die Klärung grundlegender Fragen nach weiteren Mechanismen der endokrinen Störung nicht vernachlässigt werden. Genannt wurden in diesem Zusammenhang molekulare/biochemische Parameter, Wirkungen von Mischungen, nicht-rezeptorvermittelte Wirkungen, Aktivierung von Effektketten, und Hormonbindungsstellen-unabhängige Rezeptor-Aktivierung. Forschungsthemen wie die Aufklärung molekularer Mechanismen können nützliche Hinweise geben, wie *in-vivo* Tests durch relevante Biomarker erweitert werden könnten (z.B. molekulare Mechanismen der Schilddrüsenschädigung in Amphibien, die als relevante Biomarker in einem Test mit Säugetieren Anwendung finden können).

Für die Erhaltung der Biodiversität sind vor allem bei den Invertebraten noch umfangreiche Forschungsarbeiten notwendig, da sich deren endokrine Systeme grundlegend von denen der Vertebraten unterscheiden und angesichts der Vielzahl der Organismengruppen erst wenig gesichertes Wissen vorliegt.

Es herrschte Übereinstimmung darüber, dass sowohl in der Human- als auch in der Ökotoxikologie Grundlagenforschung zu den endokrinen Systemen und Mechanismen weiterhin notwendig sei.

Schlussfolgerungen

Es besteht Handlungsbedarf auf verschiedenen nationalen und internationalen Ebenen (OECD-EDTA Gruppen / Chemikaliengesetzgebung REACH / Priorisierung von Stoffen auf EU-Ebene). Hier ist eine Bündelung der laufenden Aktivitäten erforderlich, um den steigenden Anforderungen gerecht werden zu können.

Wissenschaftler, die Testentwicklung betreiben und regulatorisch tätige Wissenschaftler müssen sich weiter annähern, um die Anforderungen aus regulatorischer Sicht schon frühzeitig bei der Testentwicklung berücksichtigen zu können. Das 3. Statusseminar war ein gelungener Beitrag dazu.

Die Übersicht über den Stand der Testentwicklungen auf OECD-Ebene zeigt, dass auf dieser Ebene weiterhin nationale Aktivitäten Deutschlands erforderlich sind, dass aber gleichzeitig die Erarbeitung einer geeigneten Test- und Bewertungsstrategie intensiviert werden muss. Die vier wesentlichen Empfehlungen des Statusseminars lauten:

1. Die Finalisierung derjenigen Projekte im OECD-Testprogramm, die bereits unter deutscher Beteiligung laufen, sollte unterstützt werden.
2. Die Entwicklung und Implementierung von Untersuchungsverfahren mit anderen potentiell gefährdeten Organismengruppen, wie verschiedenen Invertebraten-Spezies (auch Mollusken, Anneliden), sollte gefördert werden.
3. Die Identifizierung von Stoffen oder Ursachen, die bisher unerklärte Anteile an beobachteten endokrinen Wirkungen in der Umwelt hervorrufen, sollte unterstützt werden.
4. Die Aufklärung der Exposition durch Analyse von Umweltmedien und durch epidemiologische Studien sollte unterstützt werden.

Quellen

- BKH 2000. Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption – preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. BKH Consulting Engineers, Final Report, June 2000.
- BKH 2002. Study on gathering information on 435 substances with insufficient data. BKH-RPS Group, Final Report 2002.

Introduction

On June 2nd, 2005, the German Federal Environmental Agency held the Third Status Seminar "Hormones in the Environment - Scientific Basis for an Assessment". 102 experts from public authorities, universities, research institutes and non governmental organizations participated in the meeting.

In the framework of the European Strategy for Environment and Health, the Status Seminar should be a forum to elaborate scientifically sound approaches for test and assessment strategies that are suitable to serve as a basis for further recommendations and measures. To achieve this goal, scientists from research and regulatory bodies were invited to discuss existing and required experimental and theoretical work.

In his "Expert Opinion on the Environment" of 2004, the "Council of Experts for Questions of the Environment" (Rat von Sachverständigen für Umweltfragen) had pointed out that increased research and regulatory efforts were required on endocrine disrupting effects of environmental chemicals, since endocrine effect potentials were being detected for a continuously rising number of chemical substances. As the problem had already been treated in various research projects supported by the Federal Environmental Agency, a third Status Seminar should provide a platform to exchange recent research results and to elaborate a commonly agreed state of knowledge. The main topic of interest was the development of validated test methods as well as test and assessment strategies that are suitable to assess long-term effects on ecosystems. Such methods should provide a means for routine testing of single substances for interactions with the hormone system, as required for final risk assessments in the scope of legal acts.

The presentations given in the first session focused on effects on environmental organisms and human health. Main points were effects occurring in the low dose-range, effects of mixtures, and epidemiological studies on the reproductive health of humans.

The second session of the workshop focused on potential test procedures for the identification of effects on the endocrine system of vertebrates and invertebrates, and on suitable test and assessment strategies.

Summarized discussion

The questions and comments following the single presentations and the final discussion can be assigned to the following thematic fields:

- Development of test methods
- Test and assessment strategy
- Exposure
- Basic research

Development of test methods

Considering the novel EU Chemical Policy and the planned EU "REACH" legislation, there is concern about whether the presently available test methods are adequate to identify and evaluate substances which are intended to be treated as substances of particular concern in the "REACH" registration process, due to their endocrine potential. The required procedures need to be validated according to OECD criteria and should be available as OECD guidelines, further to being cost saving and simple. To be part of a reliable test strategy, the applied test procedures need to be more comprehensive than indicator tests and must be suitable to allow for quantitative statements.

It was pointed out in the following discussion that most of the established, valid and robust test methods commonly used in toxicology and ecotoxicology are frequently inadequate to determine endocrine effects, since - except for reproduction studies - they originally had been developed to detect systemic toxicity only.

With respect to procedures for the detection of mammalian toxicity, the discussions showed that the existing dosing scheme seems inappropriate to detect effects in the low dose level. To increase the significance of test results, the tests should be carried out in the low dose range and also include developing individuals. It was proposed to examine the test guidelines under this point of view and to take care that the procedures are modified accordingly.

The report on the activities of the OECD Validation Management Group „Non-Animal Assays“ made clear that Japan and the United States of America have been the most engaged countries in this group. Receptor binding tests have been established as rather cost saving and rapid screening tests to get mechanistic information. However, there is still some restraint, since in the past years *in-vitro* tests often have not met the expectations, being too insensitive or unspecific. When handling the results of *in-vitro* tests, a critical evaluation of their significance in regard of living organisms and their significance in the framework of a tiered hazard assessment is of special importance.

In the field of ecotoxicology, further to the improvement and validation of test procedures for vertebrates, there is a great demand for investigation procedures regarding other potentially endangered groups of organisms. This applies for the invertebrate groups of molluscs, annelidae and arthropods, which may considerably differ from vertebrates and from each other in their endocrine regulation. Presently, in the OECD Validation Management Group „Ecotoxicology“ all three treated invertebrate species, thereof two marine species, belong to the arthropods. Here, further investigations, including fundamental work, are

required. In the discussions, the experts emphasized that it would be desirable to have available also screening tests with invertebrate species.

Considering the development of novel tests, it was generally emphasized to consider relevant and (if possible) predictive endpoints, which indicate potential hazards for single organisms as well as for the ecosystem.

Test and assessment strategy

An essential prerequisite for a regulatory hazard and risk assessment is a conclusive concept of the required test strategy. In the past, it could happen that effects by chemical substances were overlooked, since the test strategy was not appropriate for the problem under consideration.

The discussions made clear that a reliable concept for a test strategy which is suitable for the identification and quantification of endocrine effects is not available at present. On the one hand, a respective strategy should be closely related to practical progress in evaluating and validating specific test methods, on the other hand, it should be based on a precise and scientifically sound assessment concept. In a stepwise process, progress in practical development and validation work, and the assessment concept need to be harmonized continuously. This approach could also provide an improved means of deriving potential needs for further test development.

The discussions focused on the problem of finding suitable indicator tests/information for the start level of the test strategy. A chemical's potential for disrupting endocrine processes must be identifiable or excluded beyond any doubt. While false positive results (as resulting from [Q]SAR estimations) might be tolerated, it has to be guaranteed that false negative results can be excluded. Problems are especially posed by substances for which very few effect data exist, which, moreover, do not indicate an endocrine potential. Such a lack of information cannot be an argument for an exclusion of the compound from further consideration or testing. A proposal made by the VCI (Association of the German Chemical Industry) to identify suspicious chemicals on the basis of an existing classification or labelling (e.g. the R-phrases on reproduction toxicity) was considered insufficient, since many chemical substances are not classified accordingly. For example, respective R-phrases were assigned to not more than approx 2 % of the chemicals listed in the "BKH-Verdachtsliste" (list of suspicious chemicals; BKH 2000, BKS 2002).

In view of the high number of chemical substances that need to be examined, theoretical estimations (QSARs) and/or integrative *in-vivo* tests are considered meaningful as simple and rapid indicator tests. *In-vivo* tests seem particularly sensible in case various mechanisms of action can be detected with a sole model („multimodal model“). Considering the high number of substances for which input information need to be collected, however, an *in-vivo* examination of all substances seems hardly practicable. If, on the other hand, initial testing is limited to performing *in-vitro* tests, the great variety of possible mechanisms and the comparatively low range of mechanistic tests presents the risk of overlooking an endocrine potential (for example, tests with androgenic or estrogenic receptors neither detect effects on the thyroid system nor endocrine effects that are not receptor-mediated. The participants stressed that, therefore, a sound evaluation of any available information would be essential, in order to use hints on potential modes of action as a start for a targeted test strategy for the substance under consideration, starting directly with *in-vivo* testing.

Instead of the presently favoured uterotrophic test, it was discussed to prefer an *in-vitro* test as initial test for detecting a substance's estrogenic potential, because, up to now, false negative results have been obtained more frequently from uterotrophic tests than from *in-vitro* tests. A tiered test strategy was proposed, where positive findings from *in-vitro* testing should be confirmed by the uterotrophic test, followed by a two-generation study for mammals or corresponding studies for other vertebrates.

The discussions about simple, but relevant tests for vertebrates led to the problem that potentially suitable species may show different sensitivities. With respect to the data indicating a higher sensitivity of fish compared to amphibians, it was pointed out that tests with amphibians so far have been carried out in static systems; tests in flow-through systems with constant exposure, as frequently applied for fish, presumably would result in an enhanced sensitivity of amphibians.

The participants emphasized the specific problem that none of the tests is suitable to indicate effects on human health of great concern, such as testicular cancer or breast cancer. To detect these effects, new test procedures with relevant parameters are essential. Out of the existing test methods, only reproduction studies are suitable to indicate endocrine effects. As for industrial chemicals, however, reproduction studies, if at all, are required only at a rather late phase of the stepwise test strategy, the commonly practised test strategy cannot prevent that endocrine active substances are classified as harmless. One example mentioned was DEHP: The endocrine potential (toxicity for testes) was detected only in the one generation test. From the preceding 90 day long-term test, a NOEL value had been derived that turned out to be too high to be protective.

An exposure estimation serving as the sole starting criterion for testing on endocrine effects was considered insufficient.

Exposure

In the presented epidemiological studies, the pathogenic role of endocrine disrupting chemicals for the observed disturbances of health remained unclear. In general, multiple rather than monocausal dependencies have to be assumed. Preferred meaningful and desirable investigations mentioned were either tests for xenobiotics, such as PBDE, HCB or phthalates, in the ejaculate or blood of the test persons and in maternal blood, as well as in the respective environments, or surveys allowing a retrospective evaluation of the exposure.

From the EU study on the ejaculate quality of young men, questionnaires filled in by the mothers on exposure during pregnancy and during the first years of their sons are available as well as samples of blood and ejaculate of the test persons. The questionnaires are presently being evaluated and analysed, even though additional analyses for pollutants are not possible at the moment due to lacking financial support.

It was also discussed, which parameters may be relevant for an assessment of fertility. To date, it is unclear for which range of values referring to specific physiological parameters an undisturbed reproductive capability can be assumed. Even the values on sperm quality published by the WHO only represent reference values, and cannot be considered as quality objectives.

It was stressed that many endocrine effects that had been observed in environmental organisms cannot be explained by data of chemical analyses. Therefore, increased efforts must be undertaken to identify so far undetected endocrine disrupting chemicals.

Basic research

Besides the development and validation of test procedures together with an adequate test and assessment strategy, the clarification of basic questions on further mechanisms of endocrine disruption should not be neglected. In this context, molecular/biochemical parameters, effects caused by mixtures, non receptor-mediated effects, activation of effect chains, and hormone binding site-independent activation of receptors were mentioned. Research items, such as the elucidation of molecular mechanisms, can yield useful hints on how *in-vivo* tests can be extended by relevant biomarkers (e.g. molecular mechanisms of thyroid damage in amphibians which might be applied as relevant biomarkers in a test with mammals).

Considering the maintenance of biodiversity, comprehensive research efforts are needed especially for invertebrates, since their endocrine systems are basically different from those of vertebrates; moreover, there is not much profound knowledge considering the multitude of the taxonomic groups.

There was agreement on the necessity of further basic research in human toxicology and ecotoxicology on endocrine systems and mechanisms.

Conclusions

There is a need for action on different national and international levels (OECD-EDTA groups / chemicals legislation REACH / prioritization of substances on the EU level). A joining of current activities is necessary to meet the increasing demands.

The exchange of experiences between scientists working on the development of tests and scientists of regulatory bodies needs to be increased in order to be able to consider regulatory requirements in an early stage of test development. The third Status Seminar was a successful contribution to achieve this goal.

The overview over the state of test developments on the OECD level shows that national German activities are still required on this level; moreover, it is evident that the elaboration of a suitable test and assessment strategy needs to be intensified at the same time. The four relevant recommendations of the Status Seminar are as follows:

1. The finalisation of those projects within the OECD Test Programme which are already running with German involvement should be supported.
2. The development and implementation of test procedures with other potentially endangered groups of organisms, such as different invertebrate species (including molluscs and annelidae) should be supported.

3. The identification of chemical substances or causes producing so far unexplained contributions to observed endocrine effects in the environment should be supported.
4. The clarification of exposure through the analysis of environmental media and through epidemiological studies should be supported.

Sources

- BKH 2000. Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption – preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. BKH Consulting Engineers, Final Report, June 2000.
- BKH 2002. Study on gathering information on 435 substances with insufficient data. BKH-RPS Group, Final Report 2002.

Einführung

Steinhäuser, K.-G.

Umweltbundesamt, Fachbereichsleiter FB IV "Chemikalien- und biologische Sicherheit",
06813 Dessau

Im Namen des Umweltbundesamtes will ich Sie herzlich willkommen heißen zum 3. Statusseminar Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das Endokrine System. Wie Sie vermutlich wissen, arbeitet das Umweltbundesamt seit ca. einem Monat in Dessau, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass das 4. Statusseminar in Dessau stattfinden wird. Lassen sie mich auf die vergangenen Jahre zurückblicken:

Seit über einem Jahrzehnt ist das Umweltbundesamt aktiv mit dem Thema hormonell wirkende Substanzen in der Umwelt befasst und hat wissenschaftliche Vorhaben zu diesem Thema gezielt mit Mitteln des Umweltforschungsplans gefördert. Nach einer Phase des Aufbaus und der Förderung von Arbeitsgruppen, die sich diesem Thema zuwandten, stand die Entwicklung und die Unterstützung von Testverfahren im Vordergrund. Untersuchungen mit Fischzelllinien, Amphibien und Schnecken sind prominente Beispiele. Es folgten Studien zur Beurteilung der Relevanz der beobachteten Effekte. Besonders sei hier auf epidemiologischen Untersuchungen zu genitalen Fehlbildungen und zur Spermienqualität hingewiesen. Auch die Ostseestudie zu hormonellen Wirkungen in marinen Gewässern überraschte mit der Schwere der gefundenen Effekte. In einer weiteren Phase wurde die relative Wirksamkeit von Chemikalien im Vergleich zu Phytoöstrogenen und Hormonarzneimitteln untersucht. Dabei war uns innerhalb des Umweltbundesamtes immer eine fachbereichsübergreifende Herangehensweise wichtig, z.B. der Abteilungen Chemikaliensicherheit und Wasser. Es war uns stets ein Anliegen, dass diese Forschungen einer Qualitätssicherung unterzogen werden. Die öffentliche Begleitung durch Statusseminare (0, 2) und die externe Begutachtung der Forschungsarbeiten waren dabei wesentliche Elemente.

Über den Streit der ersten Jahre, ob hormonelle Wirkungen überhaupt eine Relevanz haben, sollten wir hinaus sein. Wir verfügen heute über einen Fundus von Erkenntnissen, die uns eine erste wissenschaftliche Einschätzung erlauben. Wir sind überzeugt, dass Umwelthormone sowohl für die Gesundheit des Menschen als auch für Ökosysteme eine Relevanz besitzen. Dabei sind die Effekte nicht einheitlich. Unterschiedliche Wirkmechanismen und eine unterschiedliche Toxikokinetik machen eine standardisierte Beurteilung schwierig. Außerdem sind in mehreren Fällen vermutlich Niedrigdosiseffekte relevant, was schwierige Fragen sowohl bei der Testdurchführung als auch bei der regulatorischen Bewertung aufwirft. Wie der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen (SRU) für Deutschland in seinem Jahresgutachten 2004 sehen auch wir weiterhin Forschungsbedarf im Hinblick auf Umwelthormone, vor allem aber Handlungsbedarf. Die Forschung wird heute größtenteils durch Förderung der Europäischen Union getragen. Hier ist es uns gelungen, deutsche Forschungsgruppen gut zu platzieren. Unsere eigenen Möglichkeiten der Forschungsförderung sind dem gegenüber gering. Als Hauptaufgabe des Umweltbundesamtes sehen wir die Entwicklung und Validierung von Prüf- und Bewertungsstrategien, um einen Beitrag zu leisten, dass hormonelle Wirkungen in der regulatorischen Praxis bewertet und gemindert werden können.

Ein wichtiger Ansatzpunkt hierfür könnte das neue europäische Chemikalienmanagement REACH sein, bei dem vorgesehen ist, besonders gefährliche Stoffe einer Zulassung zu unterziehen. Als besonders gefährlich werden zunächst nur kanzerogene, mutagene und fortpflanzungsschädigende (CMR) Stoffe sowie PBT Stoffe (PBT: persistent, bioakkumulierend und toxisch) aufgeführt.

Es ist aber vorgesehen, auch andere besonders gefährliche Stoffe mit „equivalent concern“ in das Zulassungsregime einzubeziehen. Dies könnte - zumal der Gesetzestext endokrin wirksame Substanzen ausdrücklich nennt - eine Möglichkeit sein, Umwelthormone in Zukunft effektiv zu kontrollieren. Gerade dazu benötigen wir aber abgestimmte Prüf- und Bewertungsstrategien.

Ich wünsche Ihnen allen einen spannenden Verlauf der Veranstaltung und zielführende Diskussionen.

Quellen

- "Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung". Tagungsband. Berlin, 9.-10. März 1995. UBA-Texte 65/95, Umweltbundesamt (Hrsg.). ISSN 0722-186X.
- "Effects of endocrine disruptors in the environment on neuronal development and behaviour. Proceedings of the Workshop." UBA Texte 50/98, Umweltbundesamt Berlin (Hrsg.), ISSN 0722-186X. Umweltbundesamt (1998).
- "Proceedings of the "Second Statusseminar endocrine disruptors", Berlin, 2nd - 4th April 2001. Richter, A., and U. Olazabal (Eds). (2002).

Bisphenol A als Xeno-Östrogen bei Vorderkiemerschnecken*

Oehlmann, J.¹, Schulte-Oehlmann, U.¹, Bachmann, J.¹, Duft, M.¹, Oetken, M.¹, Lutz, I.², Kloas, W.², Ternes, T.A.³

¹ Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Abteilung Ökologie und Evolution, Siesmayerstr. 70, D-60054 Frankfurt

² Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Binnenfischerei, Müggelseedamm 310, D-12587 Berlin

³ Bundesanstalt für Gewässerkunde, Am Mainzer Tor 1, D-56068 Koblenz

Einleitung

Zahlreiche Umweltchemikalien sind in der Lage, die Hormonsysteme von Invertebraten, Wirbeltieren und Menschen zu beeinflussen und auf diese Weise Wachstum, Entwicklung, sexuelle Differenzierung und Fortpflanzung zu schädigen (Colborn et al. 1993). Die Mehrzahl der Studien zu hormonaktiven Substanzen widmet sich Verbindungen, die eine agonistische Wirkung am Östrogenrezeptor (ER) aufweisen (Shelby et al. 1996). Innerhalb dieser "Xenoöstrogene" spielt Bisphenol A (BPA, 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan, CAS No. 80-05-7) aufgrund des weltweit geschätzten Produktionsvolumens von 2,5 Millionen Tonnen im Jahr 2001 und seiner breiten Anwendung in verbrauchernahen Produkten eine besondere Rolle (Staples et al. 2002). BPA kommt als Intermediat bei der Herstellung von Polycarbonaten und Epoxidharzen zum Einsatz, die als Lebensmittelverpackungen, für Plexiglas und Compactdiscs eingesetzt werden. Ein geringerer Anteil der Gesamtproduktion wird als Antioxidans in Kunststoffen und hydraulischen Flüssigkeiten, für die Herstellung des Flammschuttmittels Tetrabrombisphenol A, für Thermopapiere in Druckern und Fax-Geräten, für die Reifenherstellung sowie in Dentalfüllungen und -versiegelungen verwendet (BUA 1997; Heemken et al. 2001; Staples et al. 2002).

Aufgrund des log K_{OW} von 2,20 bis 3,82 (Staples et al. 1998; Heemken et al. 2001) und einer Wasserlöslichkeit von 300 mg/L (Staples et al. 1998) ist eine moderate Bioakkumulation und Adsorption der Verbindung an Sedimente zu erwarten. Die Angaben zur Abbaubarkeit in der Umwelt sind teilweise widersprüchlich. Während in Oberflächengewässern Halbwertszeiten von 2,5 bis 4 Tagen angegeben werden (Dorn et al. 1987), liegt der entsprechende Wert für Kläranlagen bei bis zu 28 Tagen (Howard 1989). BPA kann regelmäßig in Fließgewässern nachgewiesen werden, wobei Konzentrationen von bis zu 1,9 µg/L in japanischen Flüssen belegt sind (Howard 1989). In der Elbe lagen die Konzentrationen gemäß Heemken et al. (2001) zwischen 9 und 776 ng/L im Wasser und zwischen 66 und 343 µg/kg in Sedimenten. Drei Jahre später gingen die Konzentrationen im Wasser auf 4 bis 92 ng/L zurück, während die Sedimentkonzentrationen mit 10 bis 380 µg/kg praktisch unverändert blieben (Stachel et al. 2003). In fünf weiteren deutschen Flüssen wurde die Substanz mit Maximalkonzentrationen von 272 ng/L nachgewiesen (Bolz et al. 2001).

* Diese Publikation fasst die im gleichlautenden Vortrag des 3. Statusseminars "Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System – wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung" vorgestellten Ergebnisse vom 2. Juni 2005 zusammen. Teile der Ergebnisse sind in Duft et al. (2003b) und Oehlmann et al. (2005) veröffentlicht.

Erste Hinweise auf eine östrogene Wirkung von BPA wurden bereits vor 70 Jahren gefunden, so beispielsweise in den Fütterungsexperimenten von Dodds & Lawson (1936, 1938) mit ovariectomierten Ratten, bei denen die Testsubstanz einen uterotrophen Effekt zeigte. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass BPA bei Konzentrationen von nur 2 bis 5 µg/l *in vitro* eine östrogenartige Wirkung besitzt, wenngleich die relative östrogene Potenz im Vergleich zum 17β-Östradiol (E2) um bis zu fünf Größenordnungen geringer ist (Bolger et al. 1998). Die akute Toxizität der Substanz gegenüber aquatischen Organismen ist mit einer LC₅₀ im Bereich zwischen 1 und 20 mg/L für Wirbeltiere und Invertebraten gleichermaßen niedrig (Ike et al. 2002; Hirano et al. 2004). Östrogene Wirkungen *in vivo* wurden dagegen bei deutlich niedrigeren Konzentrationen festgestellt, so die Induktion von Ovotestes beim Medaka (*Oryzias latipes*) bei Konzentrationen ab 10 µg/L (Metcalf et al. 2001). In einer Multigenerationsstudie mit Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*), die einen nominalen Konzentrationsbereich von 1 bis 1280 µg/L abdeckte, beschrieben Sohoni et al. (2001) Beeinträchtigungen der Reproduktion ab 640 µg/L. Kloas et al. (1999) ermittelten einen signifikant erhöhten Anteil weiblicher Phänotypen beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* nach einer Exposition von Kaulquappen gegenüber Konzentrationen ab 23 µg BPA/L. Im Unterschied zu diesen Studien, die erst oberhalb von 10 µg/L östrogene Wirkungen nachweisen konnten, zeigten Kwak et al. (2001) bereits bei deutlich niedrigeren, umweltrelevanten Konzentrationen eine negative Beeinflussung der geschlechtlichen Differenzierung beim Schwerträger (*Xiphophorus helleri*): Die Entwicklung des Schwerts in der Schwanzflosse als sekundäres männliches Geschlechtsmerkmal wurde bei männlichen Fischen im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 20 µg/L signifikant gehemmt.

Nur wenige Studien untersuchten bisher die östrogene Wirkung von BPA auf aquatische Invertebraten. So beschrieben Oehlmann et al. (2000), dass die Exposition einer getrenntgeschlechtlichen Vorderkiemerschnecke, der Apfelschnecke *Marisa cornuarietis*, bereits bei Nominalkonzentrationen von 1 µg BPA/L ein Superfeminisierungssyndrom induziert. Diese "Superweibchen" sind durch zusätzliche weibliche Geschlechtsorgane, eine Vergrößerung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen im Genitaltrakt, Missbildungen des pallialen Eileiterabschnitts mit einer daraus resultierenden erhöhten Mortalität und eine massive Stimulation der Ei- und Gelegeproduktion charakterisiert. Die Ergebnisse der Studie wurden in Frage gestellt, auch wegen experimenteller Mängel, wie der fehlenden analytischen Überprüfung der Nominalkonzentrationen, dem Fehlen von Replikaten und einer Positivkontrolle. Staples et al. (2002) werteten die Studie als "nicht valide", und ihre Resultate wurden für die derzeit auf EU-Ebene laufende Umweltrisikobewertung für BPA nicht berücksichtigt. Die für die BPA-Risikobewertung in Europa zuständige Behörde, die Environment Agency in London, forderte jedoch von der Kunststoffindustrie eine Wiederholung der Studie von Oehlmann et al. (2000). Das Design der geplanten Industriestudie wird allerdings, wie die Diskussionen innerhalb einer von der Environment Agency einberufenen Expertengruppe ergaben, in zahlreichen Punkten von der Originalstudie abweichen (z.B. Expositionsbedingungen, Testtemperatur und Herkunft der Testorganismen). Diese Unterschiede können, wie die Erfahrungen mit anderen Testsystemen und BPA gezeigt haben, stark divergierende Ergebnisse verursachen. Bereits bei den Wiederholungen der Originalstudie von Kloas et al. (1999) zu BPA-Effekten in *X. laevis* durch Pickford et al. (2003) und Levy et al. (2004) ergab sich, dass die Resultate der Experimente von den Expositionsbedingungen abhängen.

Es war daher das Ziel unserer eigenen, zusätzlich durchgeführten BPA-Expositionen mit *M. cornuarietis*, die Schwächen der ersten Studie bei der Wiederholung abzustellen und folgende zusätzliche Aspekte zu untersuchen: (1) Ermittlung der NOEC (no observed effect concentration) bzw. der EC₁₀ für die Auslösung von Superweibchen, (2) Überprüfung einer möglichen Abhängigkeit der Studienergebnisse von der Phase des Reproduktionszyklus, in dem sich die Tiere während der Exposition befinden, (3) Untersuchung einer möglichen Temperaturabhängigkeit der BPA-Effekte, (4) Überprüfung, ob BPA Superweibchen über den ER vermittelt induziert werden und (5) Identifizierung der Ursachen für die außerordentlich hohe BPA-Empfindlichkeit von *M. cornuarietis* im Vergleich zu anderen aquatischen Organismen. (6) Zusätzlich wurden mit einer in Europa verbreiteten Art, der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum*, BPA-Experimente mit einer Exposition über das Wasser bzw. das Sediment durchgeführt, um zu untersuchen, ob vergleichbare Effekte wie bei *Marisa* auftreten.

Material und Methoden

Für die Bisphenol A-Versuche wurden die in Mitteleuropa weit verbreitete Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* (Prosobranchia: Hydrobiidae) und die ursprünglich aus dem nördlichen Südamerika stammende Apfelschnecke *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia: Ampullariidae) eingesetzt.

Versuchsorganismen und Expositionsserien

Die Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* wurde vor etwa 150 Jahren mit dem Ballastwasser von Schiffen aus Neuseeland nach Europa eingeführt. Im Gegensatz zum ursprünglichen Verbreitungsgebiet bestehen die europäischen Populationen der Zwergdeckelschnecken fast ausschließlich aus Weibchen (Wallace 1979; Ponder 1988), die sich parthenogenetisch und ovovivipar fortpflanzen. *Potamopyrgus* erreicht eine Schalenhöhe von maximal 6 mm.

Für die Experimente wurden ausschließlich Exemplare mit einer minimalen Schalenhöhe von 3,6 mm aus unserer seit Jahren etablierten Laborzucht verwendet, die ursprünglich mit Zwergdeckelschnecken aus dem Gievenbach nahe Ibbenbüren (Nordrhein-Westfalen) aufgebaut wurde. Neben der Testsubstanz Bisphenol A (Merck Schuchardt, Hohenbrunn) wurde für die Tests auch 17 α -Ethinylostradiol (EE2: Fluka, Buchs) als Positivkontrolle (PC) berücksichtigt.

Die **aquatische Expositionsserie mit *P. antipodarum*** wurde als semistatisches System mit einer Erneuerung des Wassers nach 24 h (an Wochenenden 48 h) in voll rekonstituiertem Wasser bei Nominalkonzentrationen von 1, 5, 25 und 100 μ g BPA/L über einen Zeitraum von neun Wochen durchgeführt; zusätzlich wurde eine Lösemittelkontrolle (SC: Ethanol; Konzentration: 12,5 μ g/L) sowie EE2 als PC bei Nominalkonzentrationen von 1, 5, 25 und 100 ng/L eingesetzt. Als Testgefäße dienten 1 L-Erlenmeierkolben ohne Filteranlage, in die jeweils 100 Versuchstiere gegeben wurden. Eine Belüftung der Testansätze erfolgte über Glaspipetten. Die Stichprobengröße betrug 20 Individuen pro Versuchsgruppe. Es wurde eine Stichprobe einmalig am Anfang des Experiments und danach aus jeder Versuchsgruppe im Abstand von 3 Wochen untersucht. Der Versuch fand unter Konstantbedingungen in einem klimatisiertem Raum bei einer Temperatur von 14 \pm 1 °C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12 h statt.

Die **Sedimentexpositionsserie mit *P. antipodarum*** wurde gemäß den Angaben von Duft et al. (2003a, b) als statisches System ohne Erneuerung des Wassers in 1 L-Erlenmeierkolben ohne Filteranlage durchgeführt. Das Kunstsediment bestand aus 95 % Quarzsand (Quarzwerke Millisil, Frechen) und 5 % getrockneten Buchenblättern, die im Nationalpark Rügen gesammelt und mit einer Kaffeemühle MC 23 (Siemens) fein vermahlen wurden. Der organische Kohlenstoffgehalt des Sediments betrug 2,3 %, die mittlere Korngröße 180 µm. Jeder Erlenmeierkolben wurde mit 50 g Kunstsediment (Trockengewicht) befüllt. Die Testsubstanz wurde in 2 mL 100 % Ethanol gelöst dem Sediment zugesetzt und dieses durch Rühren homogenisiert. Das Lösemittel wurde über 24 h abgedampft und anschließend das Sediment vorsichtig mit 1 L voll rekonstituiertem Wasser überschichtet. Eine Belüftung der Testansätze erfolgte über Glaspipetten. Nach einer Equilibrierungsphase von fünf Tagen wurden in jedes Testgefäß 80 *P. antipodarum* eingesetzt. Die Experimente wurden bei Nominalkonzentrationen von 1, 10, 30, 100 und 300 µg BPA/kg (Trockengewicht) über einen Zeitraum von acht Wochen durchgeführt; zusätzlich wurde eine Lösemittelkontrolle (SC: Ethanol) und EE2 als PC bei einer Nominalkonzentration von 30 µg/kg eingesetzt. Die Stichprobengröße betrug 20 Individuen pro Versuchsgruppe. Es wurde eine Stichprobe einmalig am Anfang des Experiments und danach aus jeder Versuchsgruppe nach 2, 4 und 8 Wochen untersucht. Der Versuch fand unter Konstantbedingungen in einem klimatisierten Raum bei einer Temperatur von 15±1 °C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 16:8 h statt.

Vor der Untersuchung wurden die Zwergdeckelschnecken für 2 h in MgCl₂ (2,5 % in entmineralisiertem Wasser) narkotisiert. Die Schalen- und Mündungshöhe wurde mit einem Messokular bestimmt, die Schale mit einem kleinen Schraubstock aufgebrochen und der Weichkörper entfernt. Die Bruttasche wurde eröffnet und die Zahl der älteren Embryonen, die bereits eine Schale entwickelt hatten, der jüngeren, noch schalenlosen Embryonen und die Gesamtzahl für jedes individuelle Weibchen bestimmt. Zusätzlich wurde das Auftreten von Eiern im Eileiter und die Reife des Ovars bei jeder Schnecke überprüft.

Die für die Versuche eingesetzten Apfelschnecken kamen aus unserer laboreigenen Zucht. Der Zuchtstamm wurde ursprünglich im Jahre 1991 vom Aquazoo Düsseldorf bezogen, doch wurden seitdem regelmäßig Wildfänge aus Florida eingekreuzt, um Inzucht zu vermeiden. Die beiden Expositionsexperimente wurden als semistatische Systeme mit einer Erneuerung des Wassers nach 24 h (an Wochenenden 48 h) in 60 L-Glasaquarien durchgeführt, die über einen Eheim-Außenfilter und eine Belüftung über Glaspipetten verfügten. Beide Testserien wurden unter Konstantbedingungen in klimatisierten Versuchsräumen bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h durchgeführt.

Für die **Expositionsserie I mit *M. cornuarietis*** wurden fünf Nominalkonzentrationen von BPA (Merck Schuchardt, Hohenbrunn: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 µg/L), eine Lösemittelkontrolle (SC: Ethanol; Konzentration: 12,5 µg/L) sowie EE2 als PC bei einer Nominalkonzentration von 10 ng/L eingesetzt. Gruppen von 210 geschlechtsreifen Apfelschnecken mit einer Schalenhöhe von mindestens 20 mm wurden in den Aquarien über Aktivkohle-gefiltertes Leitungswasser bei 22±1 °C über einen Zeitraum von 6 Monaten (September bis März) exponiert, der auch die Hauptlaichperiode der Tiere in unserem Labor umfasste. 30 Tiere aus der Zucht wurden zu Beginn des Experiments und danach aus jeder Gruppe in monatlichen Abständen untersucht.

Für die **Expositionsserie II mit *M. cornuarietis*** wurden zwei Replikate mit jeweils 30 geschlechtsreifen Apfelschnecken mit einer Schalenhöhe von mindestens 20 mm gegenüber nominalen BPA-Konzentrationen (Merck Schuchardt, Hohenbrunn) von 0,25; 0,5; 1 und 5 µg BPA/L allein sowie in Kombination mit einem von zwei potenten Antiöstrogenen (3 µg ICI 182,780/L (Faslodex®, Tocris, Ellisville, USA) bzw. 10 µg Tamoxifen/L (Sigma, Deisenhofen)) über 5 Monate (Februar bis Juli) in voll rekonstituiertem Wasser bei 20±1 °C exponiert. Parallel wurde identische Versuchsgruppen unter ansonsten gleichen Bedingungen, jedoch bei 27±1 °C gegenüber den Testsubstanzen exponiert. 30 Tiere aus der Zucht wurde zu Beginn und alle überlebenden Apfelschnecken am Ende des Experiments untersucht.

Die Mortalität, Gelege- und Eizahl sowie Gelegegröße (Eizahl pro Gelege) wurden täglich erfasst. Die Fekunditätsparameter wurden bezüglich der Weibchenzahl in den Expositionsgefäßen normalisiert, wobei die Zahl der verendeten Tiere bei einem angenommenen Geschlechtsverhältnis von 1:1 berücksichtigt wurde. Alle Versuchstiere wurden vor der Untersuchung für 1,5 h narkotisiert (2,5 % MgCl₂-Lösung in entmineralisiertem Wasser). Die individuelle Schalen- und Mündungshöhe wurde auf 0,1 mm genau bestimmt und der Weichkörper anschließend aus der Schale entnommen. Das äußere Erscheinungsbild aller Geschlechtsorgane wurde überprüft und ihre Ausdehnung auf 0,1 mm genau vermessen. Das Auftreten von Oozyten und Spermien in den ableitenden Geschlechtswegen wurden ebenso wie Missbildungen, sichtbare Gewebswucherungen an den Genitalien und anderen Organen im Bereich der Mantelhöhle unter dem Stereomikroskop erfasst und protokolliert. Zusätzlich wurde der VDSI (Vas deferens Sequenz-Index = arithmetischer Mittelwert aller Imposexstadien in einer Stichprobe von 30 Tieren mit Werten zwischen 0 und 3) als Maß der Imposexintensität in einer Versuchsgruppe berechnet (Schulte-Oehlmann et al. 1995).

Begleitanalytik auf BPA

Wasserproben (2 L Volumen) wurden über einen Zyklus von 24 h während des 1., 3. und 5. Monats der Expositionsserie II und während des 1. Monats der Expositionsserie II mit *M. cornuarietis* genommen. Der Zyklus begann jeweils 15 Minuten vor dem Austausch der Expositionsmedien und endete 1 Tag später, bevor die Medien erneut ausgetauscht wurden (n = 8 pro Zyklus). Für die Festphasenextraktion wurden 500 mg RP-C18 Sorbenz (Separtis, Grenzah-Wyhlen) in Glaskartuschen gefüllt und mit 1x2 mL Hexan, gefolgt von 1x2 mL Aceton und 3x2 mL Methanol konditioniert. Die Kartuschen wurden mit 5x2 mL Wasser (pH 7) gespült. Danach wurden 0,5 L der auf pH 7 eingestellten und zuvor über einen Glasfaserfilter (<1 µm) gefilterten und mit Bisphenol F als Ersatzstandard gespikten Wasserprobe über die Kartusche gegeben (Flussrate 20 mL/min). Abschließend wurde die Festphase mit einem Stickstoffstrom für 1 h getrocknet und der Analyt viermal mit je 1 mL Aceton extrahiert. Die vereinigten Acetonextrakte wurden unter einem Stickstoffstrom auf 200 µL eingengt.

Für die GC/MS-Analytik wurde den Extrakte 50 µL einer Derivatisierungsmischung (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA)/Trimethylsilylimidazole (TMSI) / Dithioerytol (DTE), 1000+2+2; v/v/w) zugesetzt. MSTFA und TMSI wurden durch Sigma (Deisenhofen), DTE von Merck (Darmstadt) bezogen. Nach einer einstündigen Reaktion bei 60 °C wurde die Lösung unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und in 200 µL Hexan aufgenommen. Schließlich wurden 100 µg Mirex (Promochem, Wesel) zum Extrakt als interner Standard zugesetzt. Für die Quantifizierung über die GC/MS wurden m/z = 357 und 372 im SIM-Modus verwendet. Eine Zehnpunkteichung wurde in einem

Konzentrationsbereich von 0,01 bis 5 µg BPA/L mit gespiktem Grundwasser durchgeführt. Während jeder Analysenserie wurde eine Grundwasser als Nullprobe parallel untersucht.

Das GC/MS-System bestand aus einer GC HP 5890 Series II, gekoppelt mit einem HP 5971-Massendetektor. Eine Restek XTI-5 Kapillarsäule wurde bei einem Kopfdruck von 85 kPa mit einem 3 µl-Splitlessinjector verwendet (250 °C Isotherme). Als Temperaturprogramm wurde eine 50°C Isotherme für 1,5 min, 20 °C/min bis 240 °C, 1,5 °C/min bis 290 °C und eine 290 °C Isotherme für 10 min gewählt.

Rezeptorbindungsstudien

Cytosolische Extrakte der Hoden oder Ovarien von bis zu 10 Apfelschnecken wurden hergestellt, indem die Keimdrüsen in 9 mL eiskaltem Inkubationspuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 250 mM Sucrose, 10 mM Natriummolybdat, 5 mM Dithiothreitol) homogenisiert wurden. Die Homogenate wurden 12 min bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand ein zweites Mal für 60 min bei 100.000 x g und 4 °C. Der resultierende Überstand wurde als cytosolischer Extrakt für die Rezeptorbindungsstudien eingesetzt. In Zeitreihen wurden die optimalen Bedingungen für die spezifische Bindung von [³H]-Östradiol und [³H]-Testosteron (T) mit 18 h für E2 und 16 h für T bis zur Einstellung eines Fließgleichgewichts ermittelt. Die radioaktiv markierten Liganden ([³H]-E2, spezifische Aktivität 41,8 µCi/mmol, Perkin Elmer, Rodgau-Jugesheim und [³H]-T, 95 µCi/mmol, Amersham Biotech, Freiburg) wurden in 5 % Ethanol gelöst. Alle Inkubationen wurden mit 2 Replikaten unter Einsatz von 25 µL [³H]-E2 (Endkonzentration 24 nM) oder [³H]-T (Endkonzentration 22 nM), 10 µL unmarkierter Ligand oder Lösemittel, 150 µL Inkubationspuffer und 100 µL der cytosolischen Fraktion von jeweils drei unabhängigen Hoden- bzw. Ovarienhomogenaten durchgeführt. Die unmarkierten Liganden E2, Tamoxifen (Tam), BPA, T und Methyltestosteron (MT) wurden in 99,8 % Ethanol gelöst und mit Endkonzentrationen zwischen 10⁻⁹ M und 10⁻³ M zugegeben. Die Trennung der rezeptorgebundenen und freien Liganden erfolgte durch den Zusatz von 300 µL Dextran-behandelter Aktivkohle zu jeder Probe. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die Probe für 15 min bei 3500 x g und 4 °C zentrifugiert. Die freien Liganden adsorbierten an der Aktivkohle und sedimentierten mit ihr. Der Anteil des gebundenen [³H]-E2 bzw. [³H]-T wurden durch die Bestimmung der Radioaktivität von 400 µL des Überstands in 3 mL Scintillationscocktail (Ultima Gold TM, Packard BioScience, Groningen, Holland) in einem Scintillationszähler (Tri Carb 1600, Canberra-Packard, Rodgau-Jugesheim) ermittelt.

Statistische Analysen

Für die statistischen Auswertungen wurden die Computerprogramme StatEasy (Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg) und Prism, Version 4.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Als minimales Signifikanzniveau galt für alle Tests 5 % im Vergleich zur SC (p < 0,05). Die BPA-Halbwertszeit in den Expositionsaquarien wurde unter Verwendung eines einphasigen exponentiellen Zerfallmodells, die IC₅₀-Werte mittels einer homologen kompetitiven Bindungskurve für eine Klasse von Bindungsstellen und EC₁₀- sowie EC₅₀-Werte über eine Weibull-Verteilung mit Hilfe von GraphPad Prism 4.02 (San Diego, USA) berechnet.

Ergebnisse

BPA-Analytik

Aufgrund des erforderlichen Probenvolumens konnte eine analytische Überprüfung der Nominalkonzentrationen nur für die beiden Expositionsserien mit *Marisa cornuarietis* durchgeführt werden. In den Tabellen 1 und 2 sind die gemessenen BPA-Konzentrationen zusammengefasst.

Tabelle 1. Vergleich der nominalen und gemessenen BPA-Konzentrationen in der Expositionsserie I mit *Marisa cornuarietis* bei 22°C (in ng/L). Die berechnete Wiederfindung basiert auf der unmittelbar nach dem Austausch der Testmedien ermittelten Konzentration.

Nominalkonzentration	0 (SC)	50	100	250	500	1000
gemessene Konzentration						
Spanne (Min. - Max.)	0 – 40	0 – 40	0 – 180	0 – 360	0 – 590	0 – 1200
Mittelwert ± SD	9,2 ± 16	7,9 ± 16	48,3 ± 51	104 ± 120	205 ± 223	404 ± 429
BPA-Halbwertszeit (h)	—	1,06	3,03	3,76	6,35	5,89
Wiederfindung (%)	—	80	130	121	111	110

Die Anfangskonzentrationen 15 Minuten nach dem Wechsel der Expositionsmedien lagen zwischen 80 % und 130 % der Nominalkonzentrationen in der Expositionsserie I und zwischen 96 % und 110 % in der Expositionsserie II. Wahrscheinlich aufgrund einer Adsorption der Testsubstanz an Glasoberflächen, Versuchstieren und Futter sowie eines Abbaus des BPA betrug die Medianwerte der gemessenen Konzentrationen nur etwa 39,0 % bis 48,3 % der Nominalkonzentrationen, mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration in der Serie I, in der nur 15,8 % erreicht wurden. Die berechnete BPA-Halbwertszeit lag zwischen 2,53 und 6,35 h, wiederum mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration in der Serie I (1,06 h). Der Vergleich der beiden Testtemperaturen in der Expositionsserie II zeigt, dass das Verhältnis zwischen den gemessenen und den Nominalkonzentrationen nur geringe Abweichungen zeigt, obwohl bei der höheren Temperatur die analytisch bestimmten Konzentrationen geringfügig niedriger und die Halbwertszeit kürzer als bei 22°C waren (Tab. 2). Einzelne positive Nachweise von BPA in den Kontrollgruppen sind wahrscheinlich eine Folge der Freisetzung von BPA aus den vor allem in den Eheim-Außenfiltern und Schläuchen eingesetzten Kunststoffen. EC₁₀-, EC₅₀-, NOEC- und LOEC-Werte wurden grundsätzlich für alle bei *M. cornuarietis* erhobenen Endpunkte auf Basis der Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in den Aquarien berechnet.

Tabelle 2. Vergleich der nominalen und gemessenen BPA-Konzentrationen in der Expositionsserie II mit *Marisa cornuarietis* bei 20 °C und 27 °C (in ng/L). Die berechnete Wiederfindung basiert auf der unmittelbar nach dem Austausch der Testmedien ermittelten Konzentration.

Nominalkonzentration	0 (SC)	250	500	1000	5000
gemessene Konzentration (20 °C)					
Spanne (Min. - Max.)	0 – 30	0 – 270	0 – 510	0 – 1100	80 – 4900
Mittelwert ± SD	3,8 ± 11	106 ± 113	224 ± 217	465 ± 460	2170 ± 1980
BPA-Halbwertszeit (h)	—	3,04	3,90	3,67	3,75
Wiederfindung (%)	—	108	102	110	98
gemessene Konzentration (27 °C)					
Spanne (Min. - Max.)	0 – 30	0 – 260	0 – 520	0 – 1100	40 – 4800
Mittelwert ± SD	3,8 ± 11	97,5 ± 109	205 ± 204	436 ± 438	1990 ± 1930
BPA-Halbwertszeit (h)	—	2,53	3,04	3,08	3,25
Wiederfindung (%)	—	104	104	110	96

BPA-Versuchsserien mit *Potamopyrgus antipodarum*

Die Exposition der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* gegenüber BPA führte, unabhängig vom gewählten Pfad, zu einer massiven Stimulation der Embryoproduktion. Damit konnte auch für diese Art das von Oehlmann et al. (2000) erstmals am Beispiel von *Marisa cornuarietis* beschriebene Superweibchen-Syndrom mit der charakteristischen Erhöhung der Reproduktionsleistung während der sexuellen Ruhephase bestätigt werden.

Die **aquatische Expositionsserie mit *P. antipodarum*** wurde im Hochsommer durchgeführt, wenn die mittlere Embryonenzahl im Brutraum der Weibchen sehr niedrig ist. Bereits 3 und 6 Wochen nach dem Beginn des Versuchs war die Embryonenzahl in allen exponierten Gruppen gegenüber der Kontrolle erhöht; diese Differenzen waren nach 3 Wochen nur für die 25 µg/L-Gruppe und nach 6 Wochen für die 5- und 25 µg/L-Gruppen statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit multiplen Vergleich der Proben nach Nemenyi, $p < 0,05$). Es ergab sich zu beiden Zeitpunkten eine invertiert U-förmige Konzentrations-Wirkungsbeziehung, die sich auch am Versuchsende erneut einstellte (Abb. 1A). Nach 9 Wochen war die mittlere Embryonenzahl im Brutraum der Weibchen, die der niedrigsten Nominalkonzentration von BPA ausgesetzt waren, kaum noch gegenüber der Kontrolle erhöht, bei 100 µg/L sogar leicht erniedrigt, während die Weibchen aus den beiden mittleren Konzentrationen (5 und 25 µg/L) eine um den Faktor 10 gegenüber der Kontrolle erhöhte Embryonenzahl aufwiesen. In den gegenüber EE2 als PC exponierten Versuchgruppen zeigte sich ein sehr ähnliches Bild, jedoch war das synthetische Östrogen bereits bei Konzentrationen, die um den Faktor 200 niedriger lagen, vergleichbar wirksam wie BPA. In der PC ergaben sich, ähnlich wie unter dem Einfluss von BPA, bei allen Probenahmen invertiert U-förmige Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (Abb. 1A).

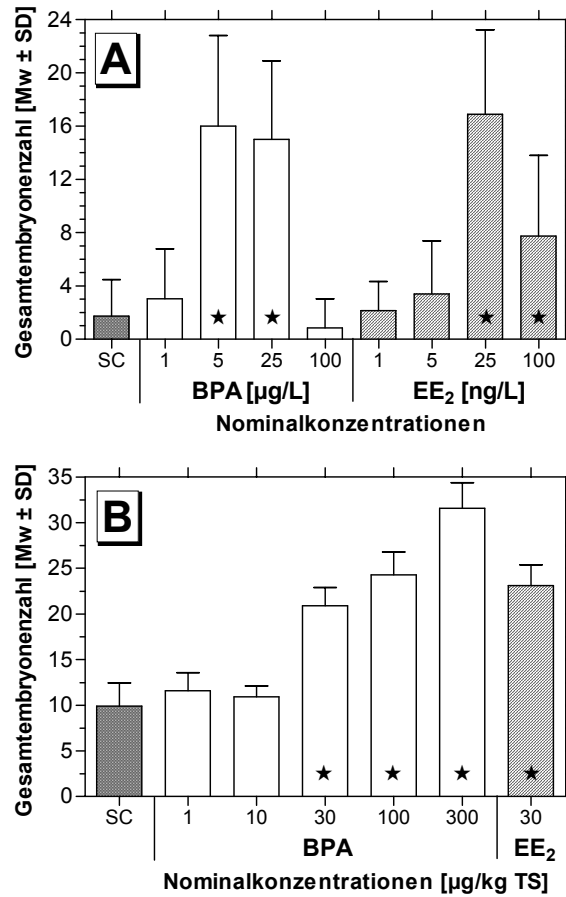


Abbildung 1. *Potamopyrgus antipodarum*. Gesamtembryonenzahl nach 9-wöchiger Exposition über das Wasser (A) bzw. 4-wöchiger Exposition über das Sediment (B). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für eine Stichprobengröße von 20 Tieren pro Versuchsgruppe in der Lösemittelkontrolle (SC), den BPA-exponierten Gruppen sowie in den Positivkontrollen mit EE₂. Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur SC (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,01$).

Auch in der **Sedimentexpositionsserie mit *P. antipodarum*** konnte eine im Versuchsverlauf zunehmende Embryonenzahl in den BPA-exponierten Versuchsgruppen festgestellt werden. Bereits nach 2 Wochen war die Zahl der jungen, noch unbeschalteten Embryonen bei 30, 100 und 300 $\mu\text{g BPA/kg}$ mit einem Anstieg von bis zu 90 % signifikant gegenüber der SC erhöht (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,05$ bei 30 $\mu\text{g/kg}$, $p < 0,01$ bei 100 und 300 $\mu\text{g/kg}$). Die EC_{10} -Berechnung für diesen Parameter ergab einen Wert von 0,09 $\mu\text{g/kg}$. Für die Gesamtzahl der Embryonen wurde der gleiche Trend beobachtet, während die Zahl der älteren, bereits beschalteten Embryonen nach zwei Wochen noch unbeeinflusst war (ANOVA, $p > 0,05$). Nach 4-wöchiger Exposition nahm die Zahl der noch unbeschalteten Embryonen um bis zu 170 % gegenüber der SC zu, wobei erneut für die drei höchsten Testkonzentrationen signifikante Effekte beobachtet wurden (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,001$). Die EC_{10} für diesen Parameter betrug 0,03 $\mu\text{g/kg}$, für die Gesamtzahl der Embryonen 2,1 $\mu\text{g/kg}$. Bezüglich der Gesamtzahl der Embryonen wurde nach vier Wochen eine NOEC von 10 $\mu\text{g/kg}$ und eine LOEC von 30 $\mu\text{g/kg}$ ermittelt (Abb. 1B).

Am Ende des 8-wöchigen Experiments wiesen alle BPA-exponierten Gruppen eine signifikant höhere Zahl unbeschalteter Embryonen im Vergleich zur SC auf (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,001$; $p < 0,01$ bei 30 $\mu\text{g/kg}$ und $p < 0,05$ bei 100 $\mu\text{g/kg}$), so dass die LOEC 1 $\mu\text{g/kg}$ betrug. Die Gesamtzahl der Embryonen war bei Konzentrationen

nen oberhalb von 1 µg/kg signifikant gegenüber der SC erhöht, so dass die NOEC und LOEC in diesem Fall 1 bzw. 10 µg/kg war. Die EC₁₀-Berechnung für diesen Parameter ergab einen Wert von 0,22 µg BPA/kg.

In der SC konnte während des gesamten Versuchsverlaufs keine Veränderung der Embryoproduktion ermittelt werden (ANOVA, $p > 0,05$), in der PC dagegen zu allen Probenahmezeitpunkten eine gegenüber der SC signifikant erhöhte Embryozahl (ANOVA mit multipltem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,01$). Keine der Versuchsgruppen wies eine erhöhte Mortalität auf.

Expositionsserie I mit *Marisa cornuarietis*

Während des Experiments, das die Hauptlaichphase der Apfelschnecken von November bis Januar umfasste, löste BPA in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen für adulte *M. cornuarietis* (Oehlmann et al. 2000) keinen Imposex aus (ANOVA und Weir-Test; $p > 0,2$). Dagegen wurden in allen Versuchsgruppen, mit Ausnahme der SC und der gegenüber nominal 100 ng BPA/L exponierten Gruppe, Superweibchen mit Eileitermissbildungen gefunden. Die Inzidenz dieser Missbildungen betrug 1,2 % bei nominal 50 ng/L, 2,0 % bei 250 ng/L, 3,1 % bei 500 ng/L, 3,2 % bei 1000 ng/L und 2,4 % in der gegenüber nominal 10 ng EE2/L exponierten PC. Im Unterschied zu den von Oehlmann et al. (2000) durchgeführten Studien bei höheren BPA-Konzentrationen wurde jedoch in keiner der Gruppen eine signifikant erhöhte Mortalität ermittelt. Die gegenüber nominal 100, 500 und 1000 ng BPA/L exponierten Weibchen sowie die Tiere in der PC produzierten über den gesamten Versuchsverlauf signifikant mehr Eier und Gelege (Daten nicht dargestellt) als die SC (Abb. 2A; ANCOVA mit multipltem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Allerdings zeigt der sigmoide Verlauf der Eisummenkurve für die SC über die Zeit in Abbildung 2A, dass die Apfelschnecken während des Experiments unterschiedliche Phasen des Reproduktionszyklus durchliefen. Entsprechend sollten die Effekte der Testsubstanz für die einzelnen Phasen getrennt analysiert werden (Abb. 2B bis D).

Während der ersten 65 Tage des Experiments, also vor dem Einsetzen der Hauptlaichperiode, stimulierte BPA die Ei- und Gelegebildung (Daten nicht dargestellt). Die Weibchen in allen Versuchsgruppen, mit Ausnahme der gegenüber nominal 50 ng BPA/L exponierten Apfelschnecken, produzierten signifikant mehr Eier als die SC (Abb. 2B; ANCOVA mit multipltem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Wenn die gemessenen Konzentrationen der Testsubstanz zugrunde gelegt werden, ergeben sich für die Stimulation der Eiproduktion eine EC₁₀ von 13,9 ng/L und der Gelegebildung von 14,6 ng/L. Die entsprechende NOEC beträgt 7,9 ng/L und die LOEC 48,3 ng/L für beide Endpunkte.

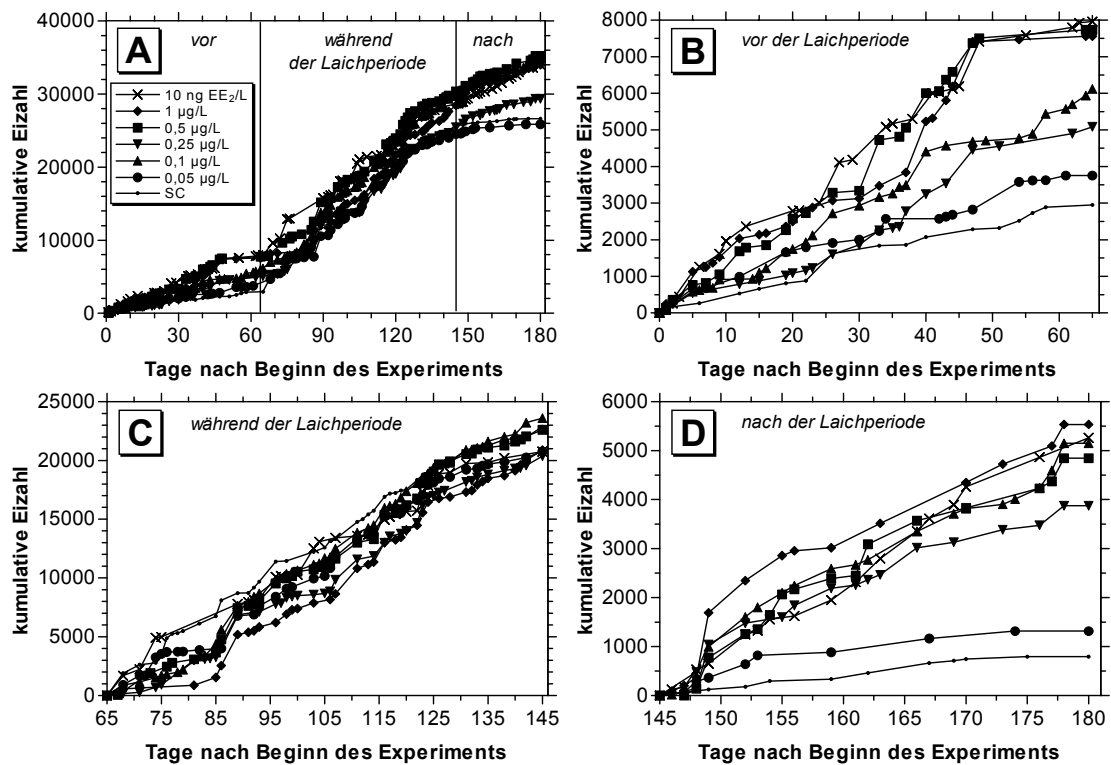


Abbildung 2. *Marisa cornuarietis*, Expositionsserie I. Kumulative, bezüglich der Weibchenzahl normalisierte Eiproduktion in der Lösemittel- (SC) und Positivkontrolle (10 ng EE₂/L) sowie in den BPA-exponierten Gruppen während des gesamten Experimentverlaufs (A) und getrennt für die Phase vor Beginn (B), während (C) und nach der Hauptlaichperiode (D).

Während die Kontrollweibchen in den ersten 65 Tagen des Experiments etwa 3000 Eier ablaichten, waren es in den folgenden 80 Tagen der Hauptlaichperiode mit 23000 Eiern fast achtmal mehr (Abb. 2C). Aufgrund dieser erheblichen Steigerung der Reproduktionsleistung in der SC konnte in keiner der BPA-exponierten Versuchgruppen eine weitere signifikante Stimulation der Ei- und Gelegebildung über das Niveau der Kontrolle hinaus beobachtet werden. Mit Ausnahme der 100 und 500 ng BPA/L-Gruppen produzierten in dieser Phase des Experiments alle anderen Versuchs-tiere signifikant weniger Eier als die Weibchen in der SC (ANCOVA mit multipltem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Während der letzten 35 Tage des Experiments, als die Hauptlaichperiode beendet war, konnte wiederum für die PC und alle BPA-exponierten Tiere, mit Ausnahme der 50 ng/L-Gruppe, eine signifikante Stimulation der Ei- und Gelegebildung beobachtet werden (Abb. 2D; ANCOVA mit multipltem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,01$). Dieses Resultat zeigt, dass während der Hauptlaichperiode der Apfelschnecken mögliche BPA-Effekte vollständig maskiert werden.

Expositionsserie II mit *Marisa cornuarietis*

Die Experimente dieser Expositionsserie dienten unter anderem dem Ziel, eine Temperaturabhängigkeit des Superweibchensyndroms bei *M. cornuarietis* zu untersuchen. Entsprechend wurden Tests bei identischen BPA-Konzentrationsbereichen bei zwei Temperaturen (20 °C und 27 °C) parallel durchgeführt. Zudem wurden die Apfelschnecken gleichzeitig gegenüber BPA und hoch wirksamen Antiöstrogenen exponiert, um zu untersuchen, ob die beobachteten Superweibchen durch eine Interaktion der Testsubstanz mit dem ER ausgelöst werden.

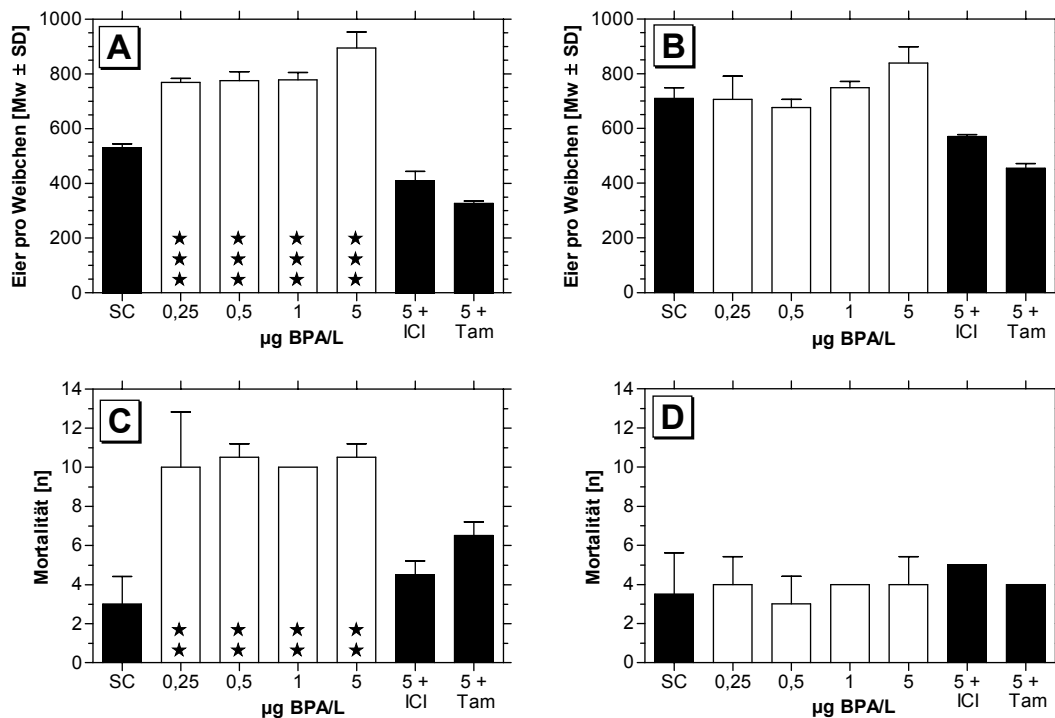


Abbildung 3. *Marisa cornuarietis*, Expositionsserie II bei 20 °C (A, C) und 27 °C (B, D). Eiproduktion pro Weibchen (A, B) und Mortalität (C, D) während des gesamten Experimentverlaufs in der Lösemittelkontrolle (SC) sowie den gegenüber BPA allein oder in Kombination mit Faslodex (ICI) bzw. Tamoxifen (Tam) exponierten Gruppen. Angegeben sind Mittelwerte (n = 2) und Standardabweichungen. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede gegenüber der SC (p < 0,01 – 0,001; ANOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls in A, B; χ^2 -Test in C, D).

Im Verlauf des bei 20 °C durchgeführten Versuchs produzierten die weiblichen *M. cornuarietis* signifikant mehr Gelege (Daten nicht dargestellt) und Eier als die Kontrolltiere (Abb. 3A; ANOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, p < 0,001). Auf Basis der gemessenen BPA-Konzentrationen ergaben sich eine EC₁₀ von 14,8 ng/L für die Ei- und 18,0 ng/L für die Gelegeproduktion und damit weitgehend identische EC₁₀-Werte zur Expositionsserie I bei 22 °C. Die LOEC betrug 106 ng/L für beide Endpunkte, während eine NOEC nicht bestimmt werden konnte, da bereits die niedrigste Testkonzentration signifikante Effekte zeigte. Bei 27 °C produzierte keine der ausschließlich BPA-exponierten Versuchsgruppen signifikant mehr Gelege als die Kontrolltiere (Daten nicht dargestellt). Für die Eiproduktion konnte ein gegenüber der SC signifikanter Anstieg bei nominal 1 und 5 µg/L auf Basis der Eisummenkurven ermittelt werden (ANCOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, p < 0,05; Daten nicht dargestellt), nicht jedoch, wenn die Eiproduktion pro Weibchen über den gesamten Versuchsverlauf aufgenommen wurde (Abb. 3B; ANOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, p > 0,05). Bei der höheren Temperatur betragen die EC₁₀-Werte 998 ng/L für die Ei- und 2,09 µg/L für die Gelegeproduktion auf Basis analytisch ermittelter BPA-Konzentrationen in den Versuchsquarieren. Die gemessene NOEC lag bei 205 ng/L und die LOEC bei 436 ng/L für die Eibildung.

Diese temperaturabhängigen Unterschiede bezüglich der BPA-Effekte bei *M. cornuarietis* sind eine direkte Folge der erhöhten Reproduktionsleistung der Kontrollschnecken bei der höheren Testtemperatur. Mit 710 ± 39,1 produzierte jedes Kontrollweibchen bei 27 °C signifikant mehr Eier als bei 20 °C mit 529 ± 15,3 (t-Test, p = 0,026). Dagegen gab es

keine temperaturabhängigen Unterschiede in der Eiproduktion, wenn die gleichen BPA-Versuchsgruppen bei beiden Temperaturen miteinander verglichen wurden.

Im Rahmen der Versuchs wurden die Apfelschnecken simultan gegenüber 5 µg BPA/L und einem potenten Antiöstrogen, entweder Faslodex® (ICI) oder Tamoxifen (Tam) exponiert, um die Spezifität des Superweibchensyndroms untersuchen zu können. Bei beiden Temperaturen antagonisierten die Antiöstrogene den stimulierenden Effekt des BPA auf die Ei- und Gelegeproduktion nicht nur vollständig, sondern die Reproduktionsleistung sank sogar unter das Niveau der SC, wie exemplarisch in den Abbildungen 3A und B für die Eibildung gezeigt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine pharmakologische Ausschaltung des ER zu einer vollständigen Aufhebung der BPA-Wirkung bei der Apfelschnecke führt. Entsprechend ist davon auszugehen, dass das Superweibchensyndrom aufgrund einer agonistischen Wirkung des BPA am ER von *M. cornuarietis* ausgelöst wird.

Während der Expositionsserie II wurden Superweibchen mit ihren charakteristischen Eileitermissbildungen nur bei 20 °C und dort ausschließlich in den rein BPA-exponierten Gruppen beobachtet. Die Inzidenz der Eileitermissbildungen betrug 4,8 % bei 0,25 µg/L, 8,0 % bei 0,5 µg/L, 14,8 % bei 1 µg/L und 11,5 % in der höchsten Konzentration. Dagegen wurden keine Eileitermissbildungen bei 20 °C in der SC und in den gegenüber BPA und den Antiöstrogenen ko-exponierten Gruppen sowie in irgendeiner Versuchsgruppe des 27°C-Experiments gefunden. Die Mortalität stieg nur in den Gruppen signifikant über das Niveau der SC an, in denen auch Weibchen mit Eileitermissbildungen auftraten (0,25, 0,5, 1 und 5 µg BPA/L bei 20 °C; Abb. 3C). Keine der Versuchsgruppen wies bei 27 °C eine gegenüber dem Kontrollniveau signifikant erhöhte Mortalität auf (Abb. 3D). Ebenso wenig konnte bei einem direkten Vergleich der Mortalität für die SC sowie für die gegenüber BPA und den Antiöstrogenen koexponierten Apfelschnecken ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Temperaturen ermittelt werden. Dagegen war die Mortalität in allen ausschließlich gegenüber BPA-exponierten Gruppen bei 20 °C gegenüber 27 °C statistisch signifikant erhöht (χ^2 -Test, $p < 0,01$).

BPA allein löste bei keiner der beiden Temperaturen in dieser Versuchsserie Imposex bei *M. cornuarietis* aus (ANOVA und Weir-Test; $p > 0,5$), doch stiegen die Imposexintensitäten bei den Schnecken, die simultan gegenüber BPA und Faslodex exponiert wurden, bei beiden Temperaturen signifikant über das Kontrollniveau an (Weir-Test, $p < 0,05$). Unter dem Einfluss der Testsubstanz trat bei den Männchen bei 20 °C, nicht jedoch bei 27 °C, eine konzentrationsabhängige Reduktion der Penislänge auf (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,01$; Daten nicht dargestellt). Die Ausdehnung anderer männlicher und weiblicher Geschlechtsorgane wurde jedoch weder bei 20, noch bei 27 °C durch BPA beeinflusst.

Rezeptorbindungsexperimente

Eine spezifische Bindung von Tritium-markiertem Östradiol ($[^3\text{H}]\text{-E2}$) und Testosteron ($[^3\text{H}]\text{-T}$) wurde in allen cytosolischen Präparationen von *M. cornuarietis* beobachtet. Die Spezifität der $[^3\text{H}]\text{-E2}$ - und $[^3\text{H}]\text{-T}$ -Bindung war in den männlichen und weiblichen Gonaden weitgehend identisch. Die spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{-E2}$ wurde in der Reihenfolge von $\text{E2} \gg \text{Tam} > \text{BPA}$ verdrängt, während T nur eine schwache Bindung aufwies (Abb. 4A). Die berechnete IC_{50} beträgt für E2 753 nM, für Tam 1,47 µM und für BPA 24,8. Die Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{-T}$ aus der spezifischen Bindung erfolgte in der Reihenfolge

T > MT = E2 > BPA (Abb. 4B). Die ermittelte IC₅₀ für T ist 849 nM, für MT 1,15 µM, für E2 1,58 µM und für BPA 62,7 µM.

Diskussion

Die neuen Ergebnisse bestätigen weitgehend die bereits durch Oehlmann et al. (2000) erzielten Befunde und zeigen, dass BPA bereits bei gemessenen Konzentrationen von 48,3 ng/L (LOEC in der Versuchsserie I) die Reproduktion von *Marisa cornuarietis* beeinflussen kann. Die Koinzidenz des Auftretens einer erhöhten Mortalität und von Superweibchen mit Eileitermissbildungen unterstützt die frühere Vermutung, dass BPA für die erhöhte Moribundität bei Konzentrationen verantwortlich ist, die um den Faktor 4000 bis 80000 niedriger liegen als für Invertebraten ermittelte LC₅₀-Werte (Staples et al. 1998). Vergleichbare Eileitermissbildungen wurden in der Vergangenheit bereits bei gegenüber Tributylzinnverbindungen (TBT) exponierten Vorderkiemerschnecken beobachtet, in diesem Fall jedoch aufgrund einer Oviduktblockade durch proliferierendes Samenleitergewebe. Als Folge der Eileiterveränderungen trat in den betroffenen Populationen eine erhöhte Weibchenmortalität und eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Männchen auf (Gibbs et al. 1987; Oehlmann et al. 1996). Für die eigenen Versuche muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Superweibchen mit Eileitermissbildungen identifiziert wurden, da die Tiere schnell nach dem Auftreten einer derart großen Wunde verenden. Im Verlauf der eigenen Versuche wurde zwar kein Hinweis auf eine statistisch signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Männchen in den ausschließlich BPA-exponierten Gruppen der Versuchsserie II gefunden, doch würde dies aufgrund der geringen Stichprobengröße von nur 30 Apfelschnecken pro Gruppe auch massive Effekte voraussetzen, die so nicht zu erwarten waren.

Die Versuchsergebnisse zu *Potamopyrgus antipodarum* bestätigen ebenfalls das östrogene Potential, das von BPA für Prosobranchier ausgeht. Sie deuten ferner darauf hin, dass gerade von sedimentgebundenen BPA-Kontaminationen erhebliche Schädwirkungen auf Vorderkiemerschnecken-Populationen ausgehen können, wie die gleich um mehrere Größenordnungen unterhalb von gemessenen Umweltkonzentrationen liegende EC₁₀ von 0,22 µg BPA/kg zeigt.

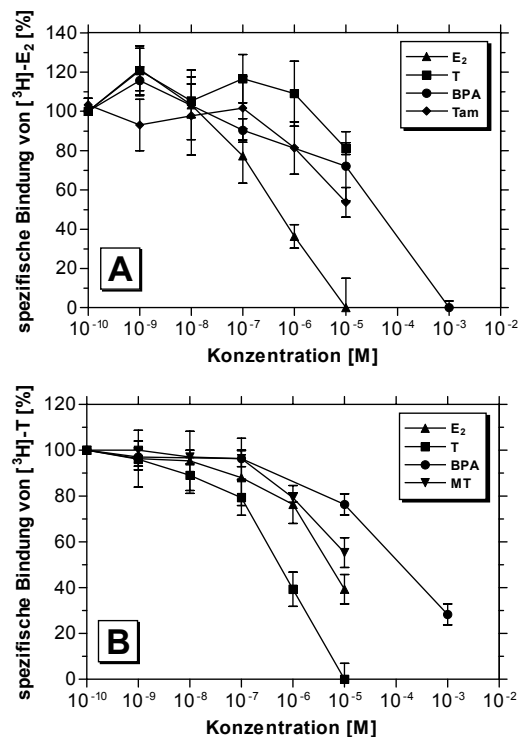


Abbildung 4. *Marisa cornuarietis*, kompetitive Verdrängung der spezifischen Bindung von $[^3\text{H}]$ -E2 (A) und $[^3\text{H}]$ -T (B) durch unterschiedliche Testsubstanzen. Angegeben sind Mittelwerte ($n = 3$) mit Standardfehlern. Die Kurven zeigen die Verdrängungsaktivität von Testosteron (T), Östradiol (E2), Bisphenol A (BPA) und Tamoxifen (Tam) im Vergleich zu $[^3\text{H}]$ -E2 und von E2, T, BPA und Methyltestosteron (MT) im Vergleich zu $[^3\text{H}]$ -T.

Bisher wurden nur relativ wenige Studien zur hormonähnlichen Wirkung von BPA bei Invertebraten veröffentlicht. Hill et al. (2002) untersuchten Wachstum und Entwicklung bei BPA-exponierten Süßwasserschwämmen der Gattung *Heteromyenia* und ermittelten signifikant niedrigere Wachstumsraten in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,16 und 160 mg/L. Zudem traten bei Konzentrationen unter 80 mg BPA/L Missbildungen bei den Schwämmen in mehreren Replikaten auf. Tominaga et al. (2003) untersuchten die Auswirkungen von BPA auf den Nematoden *Caenorhabditis elegans* über fünf Generationen. Die Fertilität war in der vierten Generation bereits bei einer Konzentration von nur 1 und 10 nM und damit weit unterhalb der LC_{50} von mehr als 100 μM signifikant reduziert.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Auslösung von BPA-Effekten stark von den experimentellen Bedingungen abhängt. So konnten Zou & Fingerman (1997) beim Wasserfloh *Daphnia magna* eine reduzierte Häutungsrate ermitteln, während Caspers (1998) keine Wirkungen der Testsubstanz fand. Segner et al. (2003) untersuchten mögliche BPA-Effekte auf Entwicklungs- und Fortpflanzungsparameter bei einer Reihe von Invertebraten, darunter *Hydra vulgaris*, *Gammarus pulex*, *Chironomus riparius*, *Hyalella azteca* und *Lymnaea stagnalis*, in Langzeitversuchen. Die Autoren stellten fest, dass eine Reihe von Verhaltensendpunkten bei relativ hohen, nicht mehr umweltrelevanten Konzentrationen beeinflusst wurden, so dass es unrealistisch wäre, für diese Effekte einen hormonmimetischen Mechanismus zu unterstellen. Marcial et al. (2003) analysierten die Auswirkungen von BPA beim Copepoden *Tigriopus japonicus* bei umweltrelevanten BPA-Konzentrationen und ermittelten Entwicklungsbeeinflussungen in der Parental- und Filialgeneration. Hahn et al. (2002) untersuchten eine Beeinflussung der Vitellogenese bei *Chironomus riparius*. BPA reduzierte bei Konzentrationen zwischen 1 und

3000 µg/L den Dotterproteingehalt frisch emergierter Mücken um 20-25 % gegenüber der Kontrolle. Vergleichbare Wirkungen von BPA wie in der vorliegenden Studie wurden von Andersen et al. (1999) für den Copepoden *Acartia tonsa* berichtet, bei dem Konzentrationen von 20 µg BPA/L zu einer Steigerung der Eiproduktion führten.

Obwohl endokrin wirksame Substanzen potentiell die Reproduktion wildlebender Tiere gefährden können, liegen bisher nur in einigen Fällen belastbare Beweise aus dem Freiland vor. So wurde ein Rückgang und sogar eine lokale Auslöschung von Populationen als direkte Folge endokriner Disruption bisher vor allem für Mollusken in Folge einer Kontamination ihrer Umwelt mit TBT nachgewiesen (Gibbs et al. 1987; Oehlmann et al. 1996). Vorderkiemerschnecken werden allgemein als eine der gegenüber endokrin wirksamen Substanzen empfindlichsten Tiergruppen überhaupt angesehen (DeFur et al. 1999). Speziell das Beispiel der durch TBT ausgelösten Imposéxentwicklung wird als eines der am besten dokumentierten Beispiele für die Beeinflussung des Hormonsystems wildlebender Tierarten durch eine Einzelchemikalie mit negativen Auswirkungen auf der Populations- und Ökosystemebene angesehen (Matthiessen & Gibbs 1998). Erst kürzlich konnten Jobling et al. (2002) mit Fischen für eine andere Gruppe vergleichbare populationsrelevante Effekte zeigen. Demnach ist der Fortpflanzungserfolg von Intersex-zeigenden Plötzen (*Rutilus rutilus*) drastisch reduziert. Gametenbildung, Spermienmotilität und Befruchtungsfähigkeit waren signifikant niedriger als bei Männchen, die keinen Intersex zeigten. Für die Vorderkiemerschnecken ist die Ähnlichkeit der Auswirkungen einer TBT- und BPA-Exposition, die sich gleichermaßen in der Auslösung von Eileiterrissen und einem daraus resultierenden Tod der Weibchen zeigt, ein deutlicher Hinweis, dass BPA ähnlich drastische ökologische Auswirkungen wie die heute weitgehend regulierte Organozinnverbindung haben dürfte. Diese Einschätzung wird nicht zuletzt durch die sehr niedrigen EC₁₀-Werte für die Auslösung von Superweibchen bei *M. cornuarietis* über das Wasser (13,9 ng/L) bzw. bei *P. antipodarum* über das Sediment (0,22 µg/kg) gestützt, die deutlich unter den in der Umwelt nachgewiesenen Konzentrationen liegen (z.B. in der Elbe bis zu 776 ng/L im Wasser und bis zu 343 µg/kg in Sedimenten gemäß Heemken et al. 2001).

Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus erstmals die Existenz spezifischer Bindungsstellen für [³H]-E2 und [³H]-T, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die funktionellen Sexualsteroid-Rezeptoren bei *M. cornuarietis* repräsentieren. Die kompetitiven Verdrängungsexperimente zeigen, dass zwei unterschiedliche Bindungsstellen auftreten, spezifisch für Androgene und Östrogene. Die ER-ähnliche Bindungsstelle weist eine hohe Affinität für E2 (IC₅₀ 753 nM), aber nur eine geringe Affinität für T auf. Darüber hinaus bindet BPA eindeutig mit einer IC₅₀ von 24,8 µM an dieses Rezeptoranalogen. Die BPA/E2-Bindungsquotienten, basierend auf den IC₅₀-Werten, betragen 33 für *Marisa*, 831 für Karpfen (Kloas et al. 2000), 719 bei *Xenopus laevis* (Lutz & Kloas 1999) und 12.400 für den humanen ERα (Matthews et al. 2001), was auf erhebliche Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen der Apfelschnecke und den Wirbeltieren hinweist. Das Antiöstrogen Tamoxifen weist ebenfalls eine moderate Affinität zur ER-ähnlichen Bindungsstelle bei *M. cornuarietis* auf, die in der Größenordnung des BPA liegt. Die Androgenrezeptor- (AR-) ähnliche Bindungsstelle bindet T erwartungsgemäß am besten (IC₅₀ 849 nM), gefolgt von einer um etwa eine Größenordnung niedrigeren Affinität zu MT und E2. BPA, das bei Wirbeltieren als Antiandrogen wirkt (Lee et al. 2003), zeigt ebenfalls eine bemerkenswerte Affinität zum AR-Analogen bei *Marisa* (IC₅₀ 62,7 µM). Die Unterschiede zwischen den Bindungsquotienten von BPA und T bei der Apfelschnecke (74) und dem Menschen (4.720, Fang et al. 2003) sind geringfügig niedriger als für den ER. Diese Ergebnisse der kompetitiven

Rezeptorbindungsstudien bei *M. cornuarietis* deuten auf die Existenz eines funktionellen ER und AR hin.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse bestätigen frühere Berichte einer östrogenen Wirkung von BPA bei Vorderkiemerschnecken. Das Auftreten von Superweibchen beeinflusst die Reproduktion und führt zu einer erhöhten Mortalität. Die Effektkonzentrationen bei *Marisa cornuarietis* (NOEC 7,9 ng/L, EC₁₀ 13,9 ng/L) und *Potamopyrgus antipodarum* (NOEC 1 µg/kg, EC₁₀ 0,22 µg/kg) liegen weit unterhalb von im Wasser und in Sedimenten gemessenen BPA-Konzentrationen in aquatischen Ökosystemen in Mitteleuropa. Die Induktion von Superweibchen bei *M. cornuarietis* wird zumindest teilweise unter Expositionsbedingungen maskiert, die die Reproduktion maximieren, beispielsweise während der Hauptlaichperiode der Schnecken oder bei erhöhten Temperaturen. Die Induktion von Superweibchen erfolgt über einen funktionellen ER, da der Effekt vollständig durch eine Koexposition der Versuchstiere gegenüber BPA und hoch wirksamen Antiöstrogenen aufgehoben werden kann. Darüber hinaus scheint die außerordentlich hohe Empfindlichkeit von *M. cornuarietis* und anderen Prosobranchier gegenüber BPA durch die höhere Affinität der Substanz zum ER im Vergleich zu Wirbeltieren begründet zu sein. Letztlich zeigen die Resultate, dass BPA eine potentielle Bedrohung für das Überleben von Vorderkiemerschnecken im Freiland darstellt.

Literatur

- Andersen HR, Halling-Sørensen B, Kusk KO (1999). A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44:56-61.
- Bolger R, Wiese TE, Irvin K, Nestich S, Checovich W (1998). Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environmental Health Perspectives* 106:551-557.
- Bolz U, Hagenmaier H, Körner W (2001). Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. *Environmental Pollution* 115:291-301.
- BUA (1997). Bisphenol A (2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan). Stoffbericht 203 des Beratergremiums für umweltrelevante Altstoffe (BUA). S. Hirzel, Stuttgart.
- Caspers N (1998). No estrogenic effects of bisphenol A in *Daphnia magna* STRAUS. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61:143-148.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993). Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101:378-384.
- DeFur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L (Hrsg.) (1999). Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing, and assessment. *Proceedings of the Workshops on Endocrine Disruption in Invertebrates*, 12-15 December 1998, Noordwijkerhout, The Netherlands. SETAC Press, Pensacola.
- Dodds EC, Lawson W (1936). Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996.
- Dodds EC, Lawson W (1938). Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proceedings of the Royal Society London B* 125:222-232.
- Dorn PB, Chou CS, Gentempo JJ (1987). Degradation of bisphenol A in natural waters. *Chemosphere* 16:1501-1507.
- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J (2003a). Toxicity of triphenyl- and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (1):145-152.
- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M, Oehlmann J (2003b). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology* 64:437-449.

- Fang H, Tong WD, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong HX, Xie Q, Perkins R, Owens W, Sheehan DM (2003). Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chemical Research in Toxicology* 16 (10):1338-1358.
- Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL, Burt GR (1987). The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.* 67:507-523.
- Hahn T, Schenk K, Schulz R (2002). Environmental chemicals with known endocrine potential affect yolk protein content in the aquatic insect *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution* 120:525-528.
- Heemken OP, Reincke H, Stachel B, Theobald N (2001). The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* 45:245-259.
- Hill M, Stabile C, Steffen LK, Hill A (2002). Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: Common developmental abnormalities. *Environmental Pollution* 117:295-300.
- Hirano M, Ishibashi H, Matsumura N, Nagao Y, Watanabe N, Watanabe A, Onikura N, Kishi K, Arizono K (2004). Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *Journal of Health Sciences* 50 (1):97-100.
- Howard PH (1989). Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Vol. I: Large production and priority pollutants. Lewis, Boca Raton.
- Ike M, Chen MY, Jin CS, Fujita M (2002). Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol A. *Environmental Toxicology* 17:457-461.
- Jobling S, Coey S, Whitmore JG, Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Beresford N, Henshaw AC, Brighty G, Tyler CR, Sumpter JP (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biology of Reproduction* 67 (2):515-524.
- Kloas W, Lutz I, Einspanier R (1999). Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *The Science of the Total Environment* 225:59-68.
- Kloas W, Schrag B, Ehnes C, Segner H (2000). Binding of xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in the teleost fish, the carp (*Cyprinus carpio*). *General and Comparative Endocrinology* 119:287-299.
- Kwak HI, Bae MO, Lee MH, Lee YS, Lee BJ, Kang KS, Chae CH, Sung HJ, Shin JS, Kim JH, Mar WC, Sheen YY, Cho MH (2001). Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (4):787-795.
- Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K (2003). Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological Science* 75:40-46.
- Levy G, Lutz I, Krüger A, Kloas W (2004). Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research* 94:102-111.
- Lutz I, Kloas W (1999). Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *The Science of the Total Environment* 225:49-57.
- Marcial HS, Hagiwara A, Snell TW (2003). Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:3025-3030.
- Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR (2001). *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β . *Chemical Research in Toxicology* 14 (2):149-157.
- Matthiessen P, Gibbs PE (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (1):37-43.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:297-308.
- Oehlmann J, Fioroni P, Stroben E, Markert B (1996). Tributyltin (TBT) effects on *Ocinebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): Imposex development, sterilization, sex change and population decline. *The Science of the Total Environment* 188:205-223.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xenoestrogens. *Ecotoxicology* 9:383-397.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Ternes TA (2005). Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally-relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives* (im Druck).

- Pickford DB, Hetheridge MJ, Caunter JE, Hall AT, Hutchinson TH (2003). Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* 53:223-235.
- Ponder WF (1988). *Potamopyrgus antipodarum* – a molluscan coloniser of Europe and Australia. *Journal of Molluscan Studies* 54:271-285.
- Schulte-Oehlmann U, Bettin C, Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E (1995). *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia): A potential TBT bioindicator for freshwater environments. *Ecotoxicology* 4:372-384.
- Segner H, Caroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schäfers C, Vandenberg GF, Watts M, Wenzel A (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: Report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3):302-314.
- Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL (1996). Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. *Environmental Health Perspectives* 104:1296-1300.
- Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M, Sumpter JP (2001). Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology* 35 (14):2917-2925.
- Stachel B, Ehrhorn U, Heemken OP, Lepom P, Reincke H, Sawal G, Theobald N (2003). Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution* 124 (3):497-507.
- Staples CA, Weeks J, Hall JF, Naylor CG (1998). Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9-alkylphenol ethoxylates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:2470-2480.
- Staples CA, Woodburn K, Caspers N, Hall AT, Klečka GM (2002). A weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment* 8:1083-1105.
- Tominaga N, Kohra S, Iguchi T, Arizono K (2003). A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Health Sciences* 49:459-463.
- Wallace C (1979). Notes on the occurrence of males in populations of *Potamopyrgus jenkinsi*. *Journal of Molluscan Studies* 45 (1):61-67.
- Zou E, Fingerman M (1997) Synthetic estrogenic agents do not interfere with sex differentiation but do inhibit molting of the cladoceran *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58:596-602.

Testverfahren bei Amphibien zum Nachweis von endocrine disruptors (ED) mit Wirkungen auf die Reproduktion und das Schilddrüsensystem

Kloas, W.^{1,2}, Bögi, C.¹, Gaete A.¹, Jagnytsch, O.¹, Krüger, A.³, Levy, G.¹, Lorenz, C.¹, Neumann, N.¹, Opitz, R.¹, Pietsch, C.¹, Schumacher, W.¹, Tillack, A.¹, Trubiroha, A.¹, Urbatzka, R.¹, Van Ballegooy, C.¹, Wiedemann, C.¹, Würtz, S.¹, Lutz, I.¹

¹Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Binnenfischerei, Müggelseedamm 310, 12587 Berlin

²Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Biologie, Abteilung Endokrinologie, Invalidenstr. 43, 10115 Berlin

³Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Chemielabor, Müggelseedamm 310, 12587 Berlin

Zusammenfassung

Die Bestimmung endokriner Wirkungen von Substanzen natürlichen und anthropogenen Ursprungs sowie deren Risikobewertung stellt ein besonders aktuelles Problem für die Ökotoxikologie dar. Bisher sind für endokrin wirksame Stoffe, die auch als „endocrine disruptors“ (ED) bezeichnet werden, vor allem Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie bei verschiedenen Tiergruppen sowie auf das Schilddrüsensystem bei Vertebraten bekannt. Die Entwicklung und Validierung geeigneter ökotoxikologischer Testverfahren zur Bestimmung dieser endokrinen Wirkungen ist immer noch im Gange und gerade mit Amphibien als Modell lassen sich die Wirkmechanismen von ED sensitiv sowohl bei der Reproduktionsbiologie, besonders aber beim Schilddrüsensystem nachweisen. Die aktuell gängigen Testverfahren bei Amphibien zum Nachweis von ED mit Wirkungen auf die Reproduktion (SEXDAMAX, sexual differentiation and metamorphosis assay *Xenopus*) und das Schilddrüsensystem (XEMA, *Xenopus* metamorphosis assay) werden vorgestellt sowie erweiterte Versuchsansätze zur Detektion spezieller Wirkmechanismen diskutiert. Im Ausblick werden mögliche weitere Endpunkte und endokrine Systeme, die durch ED bei Amphibien beeinflusst werden können, vorgestellt.

Stichworte: Amphibien, endocrine disruptors, Testverfahren, Reproduktion, Schilddrüsensystem

Einführung

Substanzen in der Umwelt können die endokrinen Systeme von verschiedenen Tiergruppen, den Menschen eingeschlossen, beeinflussen, indem sie entweder selbst wie Hormone oder Hormonantagonisten wirken oder aber die Bioverfügbarkeit der Hormone und ihre Signaltransduktionswege durch verschiedene Wirkmechanismen verändern. Die Hauptsenke dieser endokrin wirksamen Stoffe, die als "endocrine disruptors" (ED) bezeichnet werden und hauptsächlich anthropogenen Ursprungs sind, sind Oberflächengewässer, so dass vor allem aquatische Tiere, bei den Wirbeltieren besonders Fische und Amphibien, am meisten gefährdet sind (Kloas, 2002; Opitz et al., 2002).

Bisher sind Wirkungen der ED vor allem auf die Reproduktionsbiologie verschiedener Tiergruppen und das Schilddrüsensystem der Wirbeltiere nachgewiesen. Obwohl Amphi-

bien die klassischen Modelle in der Endokrinologie und Entwicklungsbiologie vor allem in Bezug auf Sexualdifferenzierung und das Schilddrüsensystem sind, haben sie erst in den letzten Jahren vermehrt an Bedeutung für Nachweise zu Wirkungen von ED vor allem auf die Reproduktion (Kloas et al., 1999; Carr et al., 2003) und das Schilddrüsensystem (Kitamura et al., 2002; Opitz et al., 2005a) gewonnen. Bei Amphibien können ED die Reproduktion durch östrogene, antiöstrogene, androgene und antiandrogene Wirkmechanismen gerade bei der Sexualdifferenzierung beeinflussen (Bögi et al., 2002; Kloas, 2002). Hierbei sollten sich die entsprechenden Wirkmechanismen auf allen Nachweisebenen wie Wechselwirkungen mit den entsprechenden Rezeptoren und Änderungen der Genexpression spezifischer Biomarker *in vivo* und *in vitro*, der Hormonspiegel und des Geschlechterverhältnisses auswirken. ED mit Wirkungen auf das Schilddrüsensystem verursachen bei Amphibien eine Beschleunigung oder Verlangsamung der Metamorphose, was auch potentiell heftige Auswirkungen auf die Überlebensrate der Nachkommenschaft hat. Neben der augenscheinlichen Beeinflussung der Morphologie während der Larvalentwicklung zeigen ED auch typische Effekte auf die Expression spezifischer Biomarker (Opitz et al., 2005b) sowie die Schilddrüsenghistologie (Tietge et al., 2005) und die biochemische Aktivität verschiedener Enzyme zur Regulierung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen.

Das breite Grundlagenwissen über die Biologie und Endokrinologie der Amphibien sowie die bisherigen Ansätze, Amphibien als Modellorganismen zum Nachweis von ED zu etablieren belegen, dass dies sehr erfolgreich möglich ist. Besonders der Nachweis von ED mit Wirkungen auf das Schilddrüsensystem, das die Amphibienmetamorphose steuert, ist bei Amphibien relativ einfach und besonders sensitiv im Vergleich zu allen anderen Wirbeltiergruppen zu bestimmen (Shi, 1999; Kloas, 2002). Dennoch sollte man sich vergegenwärtigen, dass die Vertebraten-Klasse der Amphibien aus drei Ordnungen, den Anuren (Froschlurche), Urodelen (Schwanzlurche) und Gymnophionen (Blindwühlen), besteht, die sich zumindest hinsichtlich ihrer Reproduktionsbiologie z. T. deutlich unterscheiden. Gemeinsames generelles Merkmal aller Amphibienspezies ist das Durchlaufen einer obligatorisch aquatischen Larvalentwicklung sowie der damit einhergehenden Metamorphose, der Umwandlung larvaler in adulte Stadien, die durch Schilddrüsenhormone gesteuert wird. Gerade während dieser larvalen Phase sind die Kaulquappen aufgrund ihrer aquatischen Lebensweise sowie der hohen Permeabilität ihrer Haut für die potentielle im Freiland vorhandene oder im Labor nachgestellte Exposition zu ED sehr sensibel, da sich potentielle Einflüsse auf Sexualentwicklung und Metamorphose morphologisch manifestieren können. Die gegenwärtigen Methoden und Strategien zur Identifizierung und Bestimmung von ED mit Wirkungen auf Reproduktion und Schilddrüsensystem mit Amphibien als Modell werden hier vorgestellt und diskutiert sowie ein Ausblick aus wissenschaftlicher Sicht für künftigen Forschungsbedarf zu ED mit Wirkungen auf weitere Endpunkte sowie andere endokrine Systeme gegeben. Die Weiterentwicklung entsprechender Methoden erscheint umso wichtiger, da das weltweit dokumentierte Amphibiensterben (Carey and Briant, 1995) zumindest teilweise auf ED zurückzuführen sein könnte.

Testverfahren zum Nachweis von ED mit Wirkungen auf die Reproduktion

Wie bei den meisten Tiergruppen, so sind auch bei den Amphibien die ersten Wirkungen von ED mit östrogenen Eigenschaften entdeckt worden. So konnte bei *in vivo* Expositionen von adulten Männchen mit ED eine vermehrte Bildung des Eidotterproteins Vitellogenin nachgewiesen werden (Palmer and Palmer, 1995), das natürlicherweise durch das

allen Vertebraten gemeinsame weibliche Sexualsteroid 17 β -Estradiol (E2) induziert wird. Eine umfassendere Etablierung besonders mit dem Südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Modell, erfolgte Ende der Neunziger Jahre mit Nachweisen für ED zur Bindung an den Östrogenrezeptor (Lutz and Kloas, 1999), zur Induktion von Vitellogenin-mRNA *in vitro* und zur Verweiblichung des Geschlechterverhältnisses während der larvalen Sexualdifferenzierungsphase (Kloas et al., 1999). Nachfolgende Untersuchungen führten zur Etablierung kommerzieller ELISA-Kits zur Vitellogenin-Bestimmung (Mitsui et al., 2003) und der weiteren Etablierung von Biomarkern wie dem Retinol Binding Protein, das die Detektion sowohl (anti)östrogener wie (anti)androgener Wirkungen von ED zulässt (Levy et al., 2004a).

Während bei Fischen ökotoxikologische Untersuchungen auch mit ED routinemäßig in der Regel im Durchfluss durchgeführt werden, wurden bei Amphibien bisher überwiegend semistatische Expositionen bevorzugt, teils aus Kostengründen teils aufgrund der biologischen Argumentation, dass die als Modelle verwendeten Amphibien nicht in fließenden Gewässern anzutreffen sind. Hierbei zeigte sich, dass semistatische Systeme durchaus in der Lage sind, die Wirkungen von ED prinzipiell zu vermitteln (Kloas et al., 1999; 2002; Levy et al., 2004b). Die erste Untersuchung zu ED bei Amphibien unter Verwendung von einem Durchflusssystem ergab für *Xenopus laevis* bei Exposition zur positiven Verweiblichungskontrolle mit 10⁻⁸ M E2 (Pickford et al., 2003) sogar geringere Effekte hinsichtlich der Erhöhung der weiblichen Phänotypen als sie im semistatischen System festgestellt wurden (Bögi et al., 2002; Kloas, 2002). Mittlerweile wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, um auch bei der Exposition von Amphibien-Kaulquappen im Durchflusssystem, vornehmlich mit *Xenopus laevis*, optimale Bedingungen zu erhalten, was vor allem durch die Entwicklung eines auf der Amphibienmetamorphose basierenden Schilddrüsen-Screening-Tests gefördert wurde. Deshalb konnten die hierbei gemachten Erfahrungen auch für die Exposition von *Xenopus*-Kaulquappen für die Sexualdifferenzierung herangezogen werden, und es zeigte sich, dass unter nahezu optimalen Bedingungen signifikant erhöhte weibliche Phänotypen schon bei Konzentrationen von 5x10⁻¹⁰ M E2 auftreten (eigene Untersuchungen, unveröffentlicht).

Dies belegt, dass die von mehreren Arbeitsgruppen in USA, Japan und Deutschland parallel und miteinander entwickelten Verbesserungen bei der Optimierung einer Durchfluss-Exposition für Amphibien zu einer drastischen Steigerung hinsichtlich der Sensitivität gegenüber ED führte. Die unter den mittlerweile in einer OECD-Validierung der Phase II standardisierten Bedingungen für den Schilddrüsen-Screening-Test (s. Kapitel "Testverfahren Schilddrüsenfunktion") sind auch bei einer Vorverlagerung des Expositionsbeginns bei Stadium 44/46 (Nieuwkoop and Faber, 1995) in leicht modifizierter Form anwendbar und belegen, dass Amphibien entgegen der ersten veröffentlichten Studie (Pickford et al., 2003) nun sogar mit vergleichbarer und eventuell sogar höheren Sensitivität wie bei Fischen für Untersuchungen zu Wirkungen von ED auf die Reproduktion, insbesondere die Sexualdifferenzierung, eingesetzt werden können. Da nicht nur ED sondern generell ökotoxikologische Wirkungen von Schadstoffen bei Amphibien bisher nahezu ausschließlich in semistatischen oder statischen Systemen untersucht wurden, geben diese Befunde berechtigten Anlass, die bisher in semistatischen oder statischen Expositionssystemen erhobenen Befunde hinsichtlich der Sensitivität von Amphibien neu zu bewerten. Es steht außer Frage, dass semistatische Systeme prinzipiell ökotoxikologische Wirkmechanismen belegen können, doch die neuesten Erfahrungen mit Durchflusssystemen bei Amphibien zeigen, dass hiermit die größtmögliche Sensitivität gegenüber den zu exponierenden Substanzen erhalten wird und deshalb Studien zur Risikobewertung mit Durchflusssystemen durchgeführt werden sollten.

Für Auswirkungen auf die Reproduktion ist prinzipiell der klassische Versuchsansatz von Witschi mit Steroidhormonen (Witschi and Allison, 1960) auf die Geschlechterumkehr als Endpunkt bei semistatischer Exposition immer noch gültig. Der optimale Versuchsansatz sollte hier mit *Xenopus laevis* Kaulquappen im Stadium 44/46 beginnen und bis zur Beendigung der Metamorphose von ca. 90% der Versuchstiere führen, was üblicherweise innerhalb von zwei bis zweieinhalb Monaten Dauer geschieht und die Bestimmung (anti)östrogener wie (anti)androgener Wirkmechanismen auf die Sexualdifferenzierung erlaubt (vgl. Hälterungsbedingungen bei Kloas et al., 1999; Bögi et al., 2002; Kloas, 2002; Levy et al., 2004). Die optimale Versuchsdurchführung hinsichtlich der Sensitivität wird jedoch nur mit einem Durchflusssystem erreicht (s.o.). Hierbei lassen sich nach neuesten Untersuchungen unter Laborbedingungen die bei *Xenopus laevis* mit dem Binokular erhaltenen morphologischen Bestimmungen sehr gut mit den lichtmikroskopischen Befunden zur Deckung bringen, so dass die anhand mit Binokularen erfolgte morphologische Einteilung in Männchen (differenzierte Hoden), Weibchen (differenzierte Ovarien) und Hermaphroditen (gemischt-geschlechtliche Gonaden bzw. Gonaden zweierlei Geschlechts) auch ohne weitere histologische Bearbeitung die potentiellen Effekte von ED auf die Sexualdifferenzierung zutreffend beschreibt. Vergleichende Untersuchungen mit einheimischen Spezies (*Rana temporaria*) ergaben, dass prinzipiell ähnliche Wirkungen auf die Sexualdifferenzierung vorhanden sind, die jedoch aufgrund der progynen Entwicklung der Gonaden bei Raniden wesentlich schwerer histologisch zu bearbeiten sind und deutlich größere Probenumfänge benötigen, um statistische Unterschiede herausarbeiten zu können (Bögi et al., 2003).

Semistatische Expositionen haben trotz der Vorteile von Durchflusssystemen hinsichtlich eines sensitiven Nachweises der Wirkungen von ED noch immer ihre Berechtigung, um prinzipielle Wirkmechanismen sowie potentielle Risiken von ED darzustellen, da sie sowohl bei der Handhabung einfacher wie auch den Kosten gerade bei der Applikation teurer Chemikalien oder von Umwelt-Extrakten deutlich günstiger sind und trotz gewisser Limitierungen auch Extrapolationen zu Wirkkonzentrationen im Durchflusssystem zulassen. Dies zeigt sich gerade bei jüngsten Arbeiten, die im Rahmen der EU-Projekte COMPRENDO und EASYRING durchgeführt wurden und erstmalig bei Amphibien eine Beeinflussung der Sexualsteroid-Spiegel durch Aromatase-Inhibitoren (Abb. 1) sowie der negativen feed-back-Mechanismen auf die Expression der Gonadotropine der Hypophyse, dem luteinisierenden Hormon (LH) und dem Follikel stimulierenden Hormon (FSH), (Abb. 2; Urbatzka et al., submitted) durch ED mit Wirkungen auf Östrogen- und Androgenrezeptoren bei adulten Krallenfröschen aufzeigten. Eine Veränderung der zentralnervösen GnRH (Gonadotropin releasing hormone)-Expression konnte hingegen nicht gezeigt werden (s. Abb. 2). Für eine möglichst umfassende und genaue Risikobewertung sowie der sensitiven Bestimmung von NOEC (no effect observed concentration)- und LOEC (lowest observed effect concentration)-Werten von ED sind dennoch Untersuchungen im Durchflusssystem vorzuziehen.

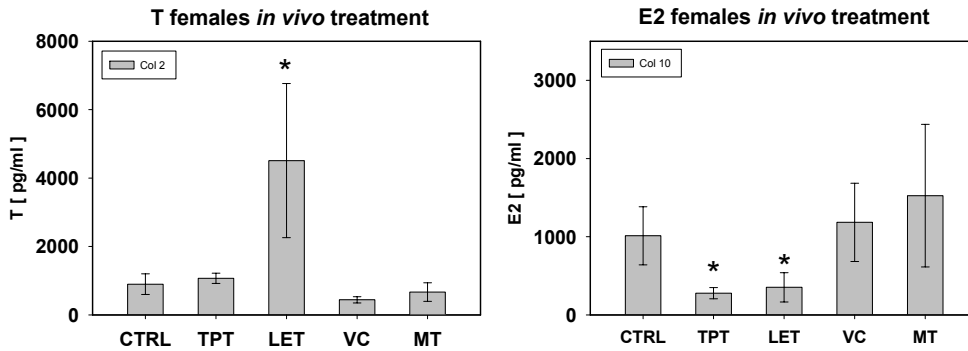


Abbildung 1: Sexualsteroidspiegel (Mittelwerte +/- SD; n=6) adulter weiblicher *Xenopus laevis* nach zwei Wochen semistatischer Exposition mit den Aromatase-Inhibitoren TPT (Triphenylzinn, 10-8 M) und LET (Letrozol, 10-6 M), dem Antiandrogen VC (Vinclozolin, 10-7 M) und dem Androgen MT (Methyltestosteron, 10-7 M). Die Estradiol (E2)-Spiegel sind durch die beiden Aromatase-Inhibitoren TPT und LET gehemmt, während die Testosteron (T)-Konzentration nur bei LET signifikant erhöht ist (COMPRENDO; Lutz et al., in prep.). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

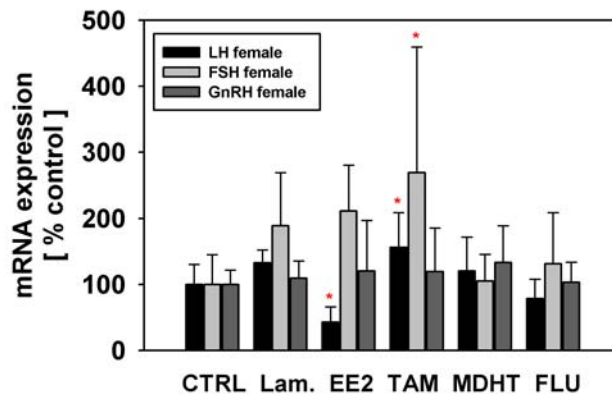


Abbildung 2: Expression der Gonadotropine LH und FSH sowie von GnRH nach vierwöchiger semistatischer Exposition mit dem Östrogen EE2 (Ethinylestradiol), dem Antiöstrogen TAM (Tamoxifen), dem Androgen MDHT (Methyldihydrotestosteron) und dem Antiandrogen FLU (Flutamid) mit 10^{-8} M sowie Flusswasser des Lambro (Lam.) eines Nebenflusses des Po (Italien) bei adulten weiblichen *Xenopus laevis*. Die Mittelwerte und SD belegen eine signifikante Hemmung der LH-Expression durch EE2, während das Antiöstrogen TAM eine Steigerung sowohl für LH- wie FSH-mRNA bewirkt (*, $p < 0,05$) (modifiziert nach Urbatzka et al., submitted).

Die hier dargestellten und zitierten exemplarischen Ergebnisse belegen, dass die Amphibien sehr gut vorhandene Wirkmechanismen von ED auf die Reproduktion nachweisen können. Auch bei Amphibien lassen sich eindeutig die durch Interaktionen mit den entsprechenden Hormonrezeptoren für Androgene und Östrogene vermittelten Wirkungen der ED nachweisen und die bisher wenig untersuchten Angriffe von ED auf die Steroidsynthese lassen sich am Beispiel der Aromatase-Inhibitoren (Abb. 1) aufzeigen. Dennoch treten einige zu diskutierende Schwierigkeiten im Vergleich zu etablierten Testverfahren bei Fischen auf. So ist z.B. ein Full-life-cycle-Test oder ein Multi-generation-Test nur schwer zu bewerkstelligen, da die Generationsdauer beim bekanntesten Labortier *Xenopus laevis* doch ca. 12 Monate dauert und schneller reproduzierende Arten wie *Silurana tropicalis* (4 bis 5 Monate) in Bezug auf ihren Einsatz in der Ökotoxikologie kontrovers diskutiert werden. Des Weiteren bestehen, wie schon eingangs erwähnt, auch bei den verschiedenen Ordnungen der Amphibien sowie innerhalb dieser Ordnungen zwischen den einzelnen Spezies bedeutende Unterschiede hinsichtlich ihrer Reproduktionsparameter (Kloas, 2002), was den an einer einzigen Art gewonnenen Aussagen zu Wirkungen von ED vor allem bei den (Anti)androgenen nicht gleich Allgemeingültigkeit verleiht. Hinsichtlich (anti)östrogener Wirkungen erscheint die Übertragbarkeit ähnlich wie bei Fischen zwischen verschiedenen Ordnungen und Spezies gewährleistet. Der vermeintliche Nach-

teil, dass Amphibien in Bezug auf (Anti)androgene heterogen sind, birgt allerdings auch Vorteile. Die Ordnung der Urodelen weist mit 11-Ketotestosteron Androgene wie bei Fischen auf, während die Anuren (*Xenopus laevis* eingeschlossen) wie bei Säugetieren (Mensch) die Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron besitzen und somit als Modelle für potentielle Übertragbarkeiten von (anti)androgenen ED-Wirkungen auf Säugetiere wesentlich besser geeignet erscheinen als Fische.

Testverfahren zum Nachweis von ED mit Wirkungen auf das Schilddrüsensystem

Ein weiterer endokriner Regelkreis, der als Ziel für ED in Frage kommt, ist das Schilddrüsensystem der Wirbeltiere. Die Schilddrüse und die von ihr produzierten Hormone steuern allgemein den Stoffwechsel, sind aber gerade für Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge von essentieller Bedeutung. Die Amphibien-Metamorphose stellt das in der Entwicklungsbiologie bei Vertebraten wohl komplexeste Beispiel für Reorganisation und Differenzierung dar, da innerhalb kurzer Zeit eine Vielzahl spezifisch gesteuerter Prozesse erfolgt. Diese bewirken die Umwandlung vom aquatischen Larval- in das z. T. terrestrisch lebende Juvenil-Stadium der Amphibien, wobei nicht nur morphologische, sondern auch vielfältige physiologische Veränderungen einhergehen (z. Übersicht Shi, 1999). Da die Schilddrüsenhormone die Hauptrolle für die komplexe Steuerung der Amphibien-Metamorphose spielen, stellen die Amphibien auch die sensitivsten Modellorganismen für ED mit Wirkungen auf das Schilddrüsensystem dar (Kloas, 2002; Opitz et al., 2002). Hierfür kommen vielfältige Wirkmechanismen in Betracht, die entweder zu einer Erhöhung oder zu einer Erniedrigung der bioverfügbaren Schilddrüsenhormone mit den entsprechenden Wirkungen, Beschleunigung bzw. Verlangsamung oder sogar Stopp der Metamorphose führen. Anders als bei den ED mit Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie, die meist über Sexualsteroidrezeptoren vermittelt werden, greifen ED bei der Schilddrüse fast ausschließlich an den vielfältigen Mechanismen zur Schilddrüsenhormon-Synthese (Jod-Transporter, Peroxidase), deren Transportproteinen (Transthyretin, Thyroxin bindendes Globulin), (de)aktivierenden Enzymen (Dejodasen) sowie Exkretionsenzymen in vielfältiger Weise an (Abb. 3).

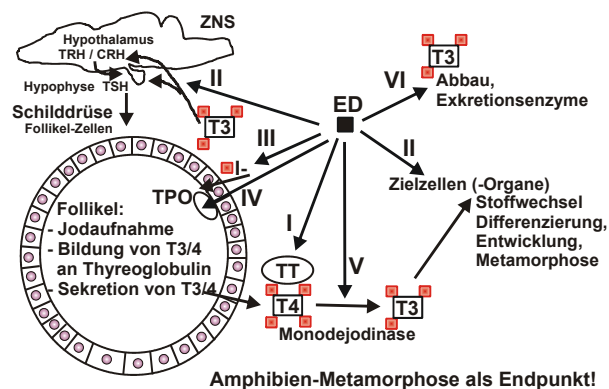


Abbildung 3: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse und mögliche Angriffspunkte von ED:

I. Interaktion mit Schilddrüsenhormon-Bindungsproteinen wie Transthyretin (TT), II. negative feed-back-Mechanismen auf das Hypothalamus-Hypophysen-System mit CRH (Corticotropin releasing hormone) als Stimulator für die TSH (thyroid stimulating hormone)-Abgabe, III. Beeinflussung des Na-Jodid-Transporters und damit der Jodid-Aufnahme (essentiell für Schilddrüsenhormon-Synthese), IV. Wirkungen auf die TPO (Schilddrüsen-Peroxidase; essentiell für Schilddrüsenhormon-Synthese), V. Aktivierung bzw. Inaktivierung der Schilddrüsenhormone durch Dejodasen und VI. Beeinflussung von Abbau- und Exkretionsenzymen für Schilddrüsenhormone.

All diese z. T. für verschiedene Entwicklungsperioden spezifischen Wirkmechanismen resultieren letztendlich in einer Änderung der bioverfügbaren Schilddrüsenhormone, was sich auf den Ablauf der Metamorphose auswirkt und somit die Stadienentwicklung als einfach zu bestimmenden Endpunkt zulässt. Bisher sind nur inhibierende Wirkungen von ED auf das Schilddrüsen-system bekannt geworden, was allerdings nicht ausschließt, dass auch stimulierende Effekte durch umweltrelevante ED vermittelt werden.

Gegenwärtig bemühen sich im Rahmen der Entwicklung für eine OECD-Testrichtlinie zum Nachweis von ED mit Wirkungen auf das Schilddrüsen-system international mehrere Arbeitsgruppen gemeinsam die Amphibien-Metamorphose als Modell für einen validen und gut reproduzierbaren Bioassay zu etablieren. Hierbei konnten die ursprünglichen experimentellen Ansätze, die aus den amerikanischen EPA-Studien (Fort et al., 2000; Tietge et al., 2005) und dem vom UBA geförderten deutschen XEMA (*Xenopus metamorphosis assay*)-Ringtest (Kloas et al., 2003; Opitz et al., 2005a) stammen, zu einem sensitiven und reproduzierbaren Screening-Test kombiniert werden, wobei sich der originäre Ansatz des deutschen Ringtests zur Steigerung der Sensitivität mit prämetamorphen Kaulquappen zu beginnen durchgesetzt hat. In der jetzt angelaufenen Validierungsphase II (perspektivischer Abschluss 1. Jahreshälfte 2006) werden durch die Arbeitsgruppen in USA, Japan und Deutschland sowie weiteren zusätzlichen Laboratorien im Rahmen eines Ringtests mehrere Substanzen mit Auswirkungen auf das Schilddrüsen-system untersucht.

Grundlage dieses mit *Xenopus laevis* durchzuführenden Ansatzes ist ebenfalls, wie schon im Kapitel "Testverfahren Reproduktion" diskutiert, ein Durchflusssystem für die Exposition. Die Exposition startet mit prämetamorphen Kaulquappen des Stadiums 51, die noch keine Schilddrüsenhormone selbst bilden und sehr sensitiv auf kleinste Schilddrüsenhormon-Mengen reagieren, für drei Wochen. In dieser Zeit entwickelt sich unter Kontrollbedingungen das funktionierende Schilddrüsen-system innerhalb der ersten Woche und die Tiere gelangen bis zum Versuchsende zur Metamorphose-Klimax (Stadium 58 und darüber). Als vorgegebene Endpunkte sind die Bestimmung einfacher morphologischer Parameter (Stadien, Hinterbeinlänge) und die Histologie der Schilddrüse enthalten und zusätzlich werden Untersuchungen zur Expression von positiven wie negativen Biomarkern wie dem Schilddrüsenhormonrezeptor β (TR β) und dem Schilddrüsen stimulierenden Hormon (TSH) (Opitz et al., 2005b; Jagnytsch et al., 2005; Opitz et al., submitted) vorgenommen mit dem Ziel die verlässlichsten und sensitivsten Endpunkte herauszufinden. Die bisherigen Ergebnisse belegen aufgrund der hohen Sensitivität der Kaulquappen für das Schilddrüsen-System beeinflussende ED, dass die Amphibien-Metamorphose tatsächlich das beste Modell auch für Säuger, den Menschen eingeschlossen, darstellt.

Weitere Testansätze, die bei kurzfristiger Exposition Auswirkungen von ED auf die Expression von Biomarkern bei Kaulquappen *in vivo* und *in vitro* (Zell- und Organ-Kulturen) untersuchen, werden vor allem hinsichtlich ihres Potentials zur Detektion der molekularen Wirkmechanismen der ED eine bedeutende Rolle spielen.

Amphibien als Studienmodell zum Nachweis von ED – Diskussion und Perspektiven

Die größte Senke für ED sind vor allem anthropogen belastete Oberflächengewässer, so dass sie besonders aquatische Tiere bedrohen. Bei Wirbeltieren sind dies vor allem Fische und Amphibien sowie deren Raptoren, die am Ende der Nahrungskette stehen.

Hierbei zeichnet sich ab, dass besonders die aufgeführten Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie und das Schilddrüsensystem ökotoxikologisch relevant sind bzw. sein können. Obwohl wie in den Kapiteln "Testverfahren Reproduktion" und "Testverfahren Schilddrüsensystem" dargelegt, die Amphibien als Modelle für die Detektion von Wirkungen der ED auf beide endokrinen Systeme sehr gut geeignet sind, wurden in der Vergangenheit überwiegend Untersuchungen mit Fischen durchgeführt, obwohl diese bei der Detektion von ED mit Wirkungen auf das Schilddrüsensystem im Vergleich zu Amphibien nur eine geringe Sensitivität aufweisen. Eine Erweiterung des XEMA zum SEXDAMAX (sexual differentiation and metamorphosis assay *Xenopus*) mit einer Vorverlegung des Expositionsbeginns auf Stadium 44/46 sowie eine Verlängerung bis zur Vollendung der Metamorphose (Dauer ca. 2,5 Monate) erlaubt die Detektion endokriner Störgrößen für beide Systeme, Reproduktion und Schilddrüse, innerhalb eines Versuchsansatzes. Die im Kapitel "Testverfahren Reproduktion" schon andiskutierten Nachteile des am besten etablierten Amphibienmodells *Xenopus laevis* aufgrund der relativ langen Generationsfolge, könnten eventuell durch Einsatz einer verwandten Spezies, *Silurana tropicalis*, umgangen werden. Da diese Spezies jedoch höhere Ansprüche an die Haltungsbedingungen erfordert und geringere Nachkommenzahlen produziert, ist diese Diskussion aus pragmatischen Gründen für *Xenopus laevis* bisher positiv ausgefallen. Dies um so mehr, da anstelle eines kompletten Life-cycle-Tests auch Partial-life-cycle-Tests durchgeführt werden können (Abb. 4). Hierbei lassen sich ausgehend von den verschiedenen Lebensstadien Untersuchungen durchführen zu: I. Fertilität und Fekundität, II. Sexualdifferenzierung und Schilddrüsensystem (SEXDAMAX und XEMA) während der Larvalentwicklung, III. Gonadenentwicklung, Enzymaktivitäten und Sexualsteroiden bei juvenilen und IV. bei adulten Tieren. Daneben ist die Etablierung Amphibien-spezifischer Biomarker mit molekularbiologischen Methoden zu allen Entwicklungsstadien *in vivo* und *in vitro* möglich.

Als mögliche apikale Endpunkte für ED-Wirkungen auf die Reproduktion bei Amphibien sind die Parameter Sexumkehr, Fertilität und Fekundität und die Sexualsteroidspiegel sowie Expression von (anti)östrogenen und (anti)androgenen Biomarkern *in vivo* und *in vitro* und die Beeinflussung der Schlüsselenzyme der Phasen I und II bei der Sexualsteroidsynthese anzusehen. Aufgrund der doch recht heterogen ausgeprägten Reproduktionsparameter hinsichtlich der Androgene, wird es kein Ein-Tier-Modell bei Amphibien für den Nachweis von (Anti)androgenen geben, während die (anti)östrogenen ED vergleichbar wie bei Fischen nachweisbar sind.

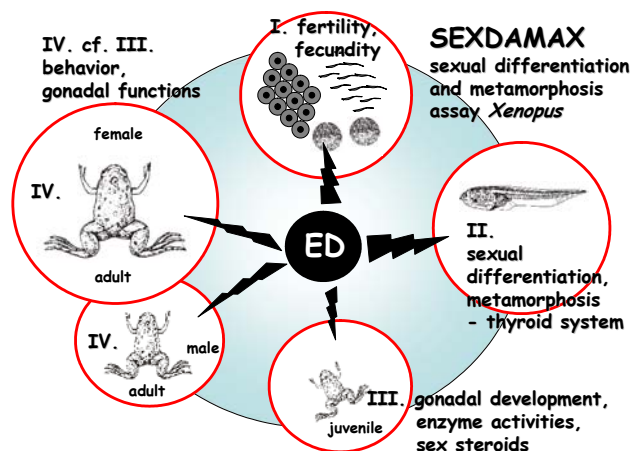


Abbildung 4: Kompletter und partieller Lebenszyklus von *Xenopus laevis* als Beispiel für die Möglichkeiten zur Detektion verschiedener Endpunkte zum Nachweis von ED mit Wirkungen auf Reproduktion und Schilddrüsensystem.

Im Gegensatz zur Vielfalt bei der Reproduktion auch hinsichtlich der Genetik (XY- vs ZW-Systeme) zeichnet sich das Schilddrüsensystem und seine Funktion für die Amphibien-Metamorphose durch ein hohes Maß an Generalität aus, so dass hier durchaus anhand eines Ein-Tier-Modells auf andere Arten übertragen werden kann. Bisher gibt es weiterhin noch keine Hinweise, dass das Schilddrüsensystem bei Amphibien anders funktioniert als das der Säuger. Nur der hypothalamische Faktor, der die TSH-Bildung in der Hypophyse regelt, ist bei Amphibien das CRH (Corticotropin releasing hormone) und nicht das TRH (thyrotropin releasing hormone) wie bei Säugern. Insgesamt stellt die Amphibien-Metamorphose als Modell zum Nachweis von ED mit Wirkungen auf das Schilddrüsensystem das bisher beste und sensitivste Screening-Test-System dar, das sich durch eine hohe Übertragbarkeit für alle Wirbeltiergruppen, den Menschen eingeschlossen, auszeichnet. Für die Bestimmung der Wirkmechanismen hierbei sind allerdings erweiterte Tests, die Kurzzeitexpositionen und *in vitro* Untersuchungen biochemischer und molekularbiologischer Art umfassen, notwendig.

Kurz- und mittelfristig besteht bei Amphibien ein großer Forschungsbedarf zur Optimierung der Expositions- und Endpunktmethoden sowie zur Bestimmung der molekularen Wirkmechanismen, die mittels adäquater *in vivo*- und *in vitro*-Ansätze unter Einsatz zellphysiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden zu untersuchen sind. Mittel- bis langfristig sind vor allem Anstrengungen zu unternehmen, gemeinsam mit Freiland-Ökologen die meist im Labor erhaltenen Befunde auch hinsichtlich ihrer Bedeutung für Populationen im Freiland zu verifizieren.

Als Ausblick für weitere vermutete potentielle Wirkungen von ED sind Wirkungen von Gestagenen auf die Reproduktion, der Einfluss von ED auf das Immunsystem und Interaktionen mit der Stressregulation, z.B. durch umweltrelevante Pharmazeutika wie β -Blocker (Propranolol) oder β -Agonisten (Isoproterenol) sowie Corticosteroid-Agonisten bzw. -Antagonisten zu nennen. Die hierfür notwendigen Methoden und Versuchsansätze bei Amphibien zu entwickeln, ist eine reizvolle und erfolgversprechende Aufgabe für alle in den letzten Jahren vermehrt an Amphibien interessierten ökotoxikologischen Arbeitsgruppen.

Danksagung

Die Etablierung von Amphibien als Modell zum Nachweis für ED mit Wirkungen auf die Reproduktion erfolgte bzw. erfolgt bei unserer Arbeitsgruppe mit dankenswerter Unterstützung durch das Ministerium für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg (BW-PLUS, Projekt BWB 20006), das Umweltbundesamt (FKZ 29864219 und 29965221/22), das Bundesministerium für Bildung und Forschung (GLOWA-Elbe, Projekt 01 LW 0313) und die EU (Projekte EASYRING contract-nr. QLK4-CT-2002-02286 und COMPRENDO contract-nr. EVK1-CT-2002-00129). Die Etablierung und Validierung des Schilddrüsentests mit der Amphibien-Metamorphose als Modell wurde bzw. wird durch das Umweltbundesamt gefördert (FKZ 20067409, 20367450 und 20467454/01).

Literatur

- Bögi C, Levy G, Lutz I, Kloas W (2002). Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comp Biochem Physiol B* 133 (4): 559-570.
- Bögi C, Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Steineck C, Kalbfus W, Negele RD, Lutz I, Kloas W (2003). Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. *Environ Res* 93: 195-201.
- Carey C, Bryant C (1995). Possible interactions among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environ Health Perspect* 103, 13-17.
- Carr J, Gentles A, Smith E, Goleman W, Urquidi L, Thuett K, Kendall R, Giesy J, Gross T, Solomon K, Van der Kraak G (2003). Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environ Toxicol Chem* 22: 396-405.
- Fort DJ, Rogers RL, Morgan LA, Miller M, Clark P, White JA, Paul R, Stover E (2000). Preliminary validation of a short-term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis*. *J Appl Toxicol* 20: 419-425.
- Jagnytsch O, Opitz R, Lutz I, Kloas W (2005). Effects of tetrabromobisphenol A on larval development and thyroid hormone regulated biomarkers of the amphibian *Xenopus laevis*. *Environ. Res.* (accepted)
- Kitamura S, Jinno N, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N (2002). Thyroid hormonal activity of the flame retardants terabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Research Comm* 293: 554-559.
- Kloas W (2002). Amphibians as model for the study of endocrine disruptors. *Int Rev Cytol* 216: 1-57.
- Kloas W, Lutz I, Einspanier R (1999). Amphibians as model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci Total Environ* 225: 59-68.
- Kloas W, Opitz R, Lutz I (2003). Ringtest: Effects of pesticides and other chemicals on thyroid system in the amphibian *Xenopus laevis*. Federal Environmental Agency Research Report 20067409, Berlin, Germany.
- Levy G, Lutz I, Krüger A, von Tümpling W, Kloas W (2004a). Retinol binding protein as a biomarker to assess endocrine disrupting compounds in the environment. *Anal Bioanal Chemistry* 378: 676-683.
- Levy G, Lutz I, Krüger A, Kloas W (2004b). Bisphenol A induced feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ Res* 94: 102-111.
- Lutz I, Kloas W (1999). Amphibians as model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci Total Environ* 225: 49-57.
- Mitsui N, Tooi O, Kawahara A (2003). Sandwich ELISAs for quantification of *Xenopus laevis* vitellogenin and albumin and their application to measurement of estradiol-17 β effects on whole animals and primary-cultured hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C* 135: 305-313.
- Nieuwkoop PD, Faber J (1994). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), 3rd ed. Garland, New York, USA.
- Opitz R, Levy G, Bögi C, Lutz I, Kloas W (2002). Endocrine disruption in fishes and amphibians. *Transworld Research Network, Recent Res Devel Endocrinol* 3: 127-170.
- Opitz R, Braunbeck T, Bögi C, Pickford D, Nentwig G, Oehlmann J, Tooi O, Lutz I, Kloas W (2005a). Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay (XEMA) for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds. *Env Tox Chem* 24 (3): 653-664.
- Opitz R, Lutz I, Nguyen N, Scanlan T, Kloas W (2005b). The analysis of thyroid hormone receptor β A mRNA expression in *Xenopus laevis* tadpoles as a means to detect agonism and antagonism of thyroid hormone action. *Tox Appl Pharmac* (in press)
- Opitz R, Hartmann S, Blank T, Braunbeck T, Lutz I, Kloas W (2005). Evaluation of histological and molecular biological endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles. *Toxicol Sciences* (submitted)
- Palmer B, Palmer S (1995). Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog. *Environ Health Perspect* 103: 19-25.
- Pickford D, Hetheridge M, Caunter J, Hall A, Hutchinson T (2003). Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through system. *Chemosphere* 53: 223-235.
- Shi YB (1999). Amphibian metamorphosis. From Morphology to Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York, US, pp. 288.
- Tietge JE, Holcombe GW, Flynn K, Kosian PA, Korte J, Anderson LE, Wolf D, Degitz SJ (2005). Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate: Effects on development and thyroid histology. *Environ Tox Chem* 24: 926-933.
- Urbatzka R, Lutz I, Opitz R, Kloas W (2005). Luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and gonadotropin releasing hormone mRNA expression of *Xenopus laevis* in response to endocrine disrupting compounds affecting reproductive biology. *Gen Comp Endocrinol* (submitted)
- Witschi E, Allison J (1950). Responses of *Xenopus* and *Alytes* to the administration of some steroid hormones. *Anat. Rec.* 108: 589-590.

Are there risks from low dose mixture effects of endocrine disruptors?

Kortenkamp, A.¹; Silva, E.¹; Rajapakse, N.², Scholze, M.¹

¹University of London, School of Pharmacy, Centre for Toxicology, 29-39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, United Kingdom

²Food Standards Agency, Aviation House, 125 Kingsway, London, WC2B 6NH, United Kingdom

Introduction

The discrepancies between the high concentrations of endocrine disrupting chemicals that are needed to elicit effects in laboratory assays, and the levels found in human tissues and the environment are enormous. This has led many to argue that risks to human health or wildlife stemming from these chemicals are negligible (Safe 1995). However, this line of argumentation ignores the fact that humans and wildlife are exposed not to single agents, but to mixtures of endocrine disruptors. Even so, the observation that over 95% of the resources in toxicological research have, in the past, been devoted to the study of single chemicals (Yang et al. 1994) is also true for endocrine disruptors. To date, tens of thousands of papers on endocrine disruptors have appeared, but the number of publications describing their mixture effects has not even reached 100.

The early work on mixtures of endocrine disruptors was motivated by a systematic search for synergisms. In 1996, a report claiming spectacular synergisms between binary mixtures of estrogenic pesticides was published (Arnold et al. 1996), but had to be withdrawn because the experimental results could not be reproduced by other laboratories (Rama-moorthy et al. 1997; Ashby et al. 1997). Since synergisms were absent, this episode has led many to question the overall importance of combination effects of endocrine disruptors.

However, to dismiss the relevance of mixture effects would be premature without considering the possible implications of apparently less spectacular additive combination effects. Human and wildlife exposure is to large numbers of endocrine disruptors, all at quite low levels. Rather than searching for synergisms, it is more pressing to explore whether endocrine disruptors can act together to produce significant responses when combined at concentrations which individually do not induce observable effects. Do current approaches in risk assessment provide sufficient protection from possible combination effects of multiple endocrine disruptors in the low dose range?

Concepts for the prediction and assessment of mixture effects

In dealing with mixtures experimentally it is often thought that every conceivable combination of endocrine disruptors needs to be tested. However, this would be very time-consuming and for the purposes of risk assessment and chemicals regulation, is, in the long run, unsustainable. It is more practical to evaluate whether it is possible to accurately predict combination effects of multiple chemicals, when the effects of all components in the mixture are known. This can be achieved by conducting targeted experiments with a few well-chosen reference mixtures. Assuming (i) mixture effects are predictable and, (ii) there are regular relationships between the potency of individual chemicals and the ways in

which they act together, powerful tools for prospective risk assessment that could make productive use of existing single chemical data bases may then become available.

Not all types of mixtures are suitable for this approach. For example, one chemical, itself not inducing the effect of interest, could modify the responses provoked by a second agent. In these cases, the resulting combination effect is difficult to predict from knowledge about the effect profile of the individual components. Often, however, all mixture components themselves induce the effect of interest, and in these cases it may be possible to anticipate the resulting joint effect. To deal with mixtures of chemicals that all produce the same effect, several approaches are available:

Effect summation

It is often said that the effects of a combination of chemicals may be smaller or larger than the sum of the individual effects of all components. Without further justification, this is frequently taken to mean that the anticipated combination effect is accessible by calculating the simple arithmetic sum of the individual effects of all chemicals. However, the fallacy of this expectation becomes obvious when considering the hypothetical case of 10 agents that each provoke 15% of a certain response. The expectation from effect summation that the resulting joint effect should be $10 \times 15\% = 150\%$ turns out to be biologically impossible, if the maximum inducible effect is only 100%.

Thus, approaches are required that provide more reliable calculations of mixture effects, such that a reference point for the assessment of combination effects in terms of synergism, additivity and antagonism can be defined. For this purpose, two concepts are available, *dose addition* (often referred to as concentration addition) and *independent action* (also called response multiplication or response addition). The concepts are used depending on the presumed modes of action of the mixture components. Any deviation from anticipated (additive) combination effects can then be classed as synergism (if the observed effects are larger than expected) or antagonism (if observation falls short of anticipation).

Dose addition

Dose addition is applied to mixtures of chemicals that exert their effects through similar modes of action. Examples include organophosphorus pesticides and polychlorinated dioxins and furans, and also estrogenic agents, to name but a few. Because these chemicals interact with well-defined molecular targets, it is thought that one chemical can be replaced totally or in part by an equal fraction of an equi-effective concentration of another, without diminishing the overall combined effect (Loewe and Muischneck 1926). If the assumption of *dose addition* holds true, these fractions of equi-effective concentrations, which are also called toxic units, sum up to a value of 1 – therefore the name dose or concentration addition. A widely used application of *dose addition* is the “toxic equivalence factor” (TEF) concept for the assessment of mixtures of polychlorinated dioxins and furans (PCDD/F) (van den Berg et al. 1998). Under the additional assumption of parallel dose-response curves, doses of specific PCDD/F isomers are all expressed in terms of the dose of a reference chemical, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), needed to induce the same effect (“equivalent” or “equi-effective” dose). The assessment of the resulting combined effect is obtained simply by adding up all equivalent TCDD doses.

The concept of *dose addition* implies that, irrespective of concentration, every toxicant contributes in proportion to its concentration to the overall toxicity of a mixture. Whether the individual doses are also effective alone does not matter. Thus, combination effects should also result from toxicants at or below effect thresholds, provided sufficiently large numbers of components sum up to a sufficiently high total effect dose.

Independent action

Independent action (often also called response addition) is used for combinations of agents with diverse modes of action. By activating differing effector chains, every component of a mixture of dissimilarly acting chemicals is thought to provoke effects independent of all other agents that might also be present. The resulting combined effect can be calculated from the effects caused by the individual mixture components by adopting the statistical concept of independent events (Bliss, 1939). This means that agents present at doses below effect thresholds (i.e. zero effect levels) will not contribute to the joint effect of the mixture, and if this condition is fulfilled for all components, there will be no combination effect. This central tenet of the concept of *independent action* is commonly taken to mean that exposed subjects are protected from mixture effects as long as the doses of all agents in the combination do not exceed their no-observed-effect-levels (NOEL).

Aims and experimental approaches

In view of their relevance to the regulation of mixtures of endocrine disrupters, we became interested in addressing the following questions:

- (1) Is it possible to predict the (additive) joint effect of combinations of multiple endocrine disrupters on the basis of information about their individual potency?
- (2) Do endocrine disrupters contribute to mixture effects when they are present at levels that individually do not induce observable effects?

Conclusive answers to these questions require quantitative comparisons between predicted and experimentally observed mixture effects. Experimentally, the task can be approached in a step-wise fashion: (1) Dose-response curves for all single mixture components are recorded. These data are essential for the (2) calculation of additivity expectations according to *dose addition* or *independent action*. (3) The mixture experiment is conducted, and (4) the observed combination effects are compared with the predicted responses.

The fixed mixture ratio approach

An extension of dose-response analyses to combinations of two chemicals will transform the familiar two-dimensional sigmoidal plots into a three-dimensional response surface. If this approach is applied to a mixture composed of n chemicals, a $(n+1)$ -dimensional surface will be obtained. For obvious reasons, visualisation of such a response surface is beyond the limits of human imagination. Although research conducted in the last years has yielded optimised strategies for designing and analysing response surface mixture studies, this approach has its experimental limitation, as an increasing number of compounds leads to unrealistic data requirements. Thus, partial representations of the effects of multi-component mixtures in multi-dimensional space are needed, and this can be

achieved in two ways. (1) The dose of only one mixture component is varied, while the remainder of the chemicals is kept constant. This would allow studies of the impact of one agent on the effects of many others. (2) Alternatively, the mixture ratio of the combination is kept unchanged, and the effect of varying the total mixture concentration is analysed. This latter approach, termed the fixed ratio approach (Hewlett and Plackett 1959, Altenburger et al. 2000), lends itself to the assessment of multi-component mixtures and was utilised in our studies of endocrine disrupter mixtures.

Endpoints and bioassays

To make the assessment of multi-component mixtures a viable proposition, a number of practical experimental requirements had to be taken into account. Of particular importance were demands of minimal data variation and high reproducibility, for the following reasons: (1) When dealing with a large number of mixture components, the parallel testing of all agents and their mixtures is not a realistic option. Thus, reliance had to be made on historical data, and this placed great emphasis on the reproducibility of test outcomes. (2) To address the issue of mixture effects at low levels of all components, the effects of small doses of test chemicals had to be estimated reliably, and to this end it was desirable to use assays that produce data with relatively small variation.

The high demands in terms of data variation and high through-put were more likely to be met with *in vitro* rather than with *in vivo* assays. For these reasons, the yeast estrogen screen (YES) (Routledge and Sumpter 1996) and the E-Screen assay (Soto et al. 1995) were selected for multi-component mixture studies. Detailed information about experimental procedures and protocols can be found in Silva et al. (2002) and Rajapakse et al. (2004).

Selection of test compounds and mixtures

The main aim of our studies was to assess whether the effects of multi-component mixtures of endocrine disrupters can be predicted reliably on the basis of information about the potency of individual mixture components. To realise this aim experimentally, a number of further requirements had to be considered:

(1) The mathematical features of *dose addition* (explained in Payne et al. 2001 and Rajapakse et al. 2004) mean that only doses (or concentrations) corresponding to defined effect levels can be estimated. For this reason, mixture effect predictions derived from *dose addition* cannot exceed the smallest maximal effect induced by any one mixture component. This may lead to problems with mixtures composed of agents that exhibit low maximal effects. To enable mixture effect predictions over a large range of effects, we set the criterion that the test chemicals had to induce at least 60% of a maximally possible response. Thus, our interest in achieving valid assessments of predictability forced us to construct reference mixtures, and this had to be the driver of test chemical selection in the first instance. Questions of environmental relevance, although important, initially had to take second place.

(2) For similar reasons, a situation had to be avoided where only a few, or even one, mixture components dominated the overall combination effect, with the remainder of the agents contributing very little, if anything. Furthermore, if one (or more) components are responsible for a synergism or antagonism, it is likely that such phenomena are obscured when chemicals are present at concentrations that contribute little to the total mixture

effect. Thus, the mixture ratios had to be carefully chosen to ensure that all chemicals contributed in equal measure to the joint effect of the mixture. This was achieved by mixing the chemicals in proportion to their individual potency.

“Similar” versus “dissimilar” action – the extremes of a spectrum of possibilities

Of great importance for assessing mixture effects in terms of synergisms, additivity or antagonism, is the choice of an appropriate concept – *dose addition* or *independent action*. This is because both concepts do not necessarily yield the same additivity expectation in all cases (Drescher and Boedeker 1995). To allow correct choices, decisions have to be made as to whether the mixture in question is similarly acting or dissimilarly acting. In taking such decisions, it is important to bear in mind that *dose addition* and *independent action* may represent the extremes of a spectrum of possibilities. The two concepts offer mathematical tools for mixture effect predictions which differ fundamentally in their features. However, biological realities do not necessarily always follow mathematics. Only a few mixtures are fully described by either of the two concepts, and usually these cases represent artificial scenarios designed for research purposes. “Real world” mixtures usually involve a wide variety of modes of action, not entirely captured by either *dose addition* or *independent action*. Thus, if a mixture does not fulfil the similarity criteria to qualify for application of *dose addition* (a case of “non-similar” action), it does not follow that it is dissimilarly acting and should follow *independent action*.

Furthermore, in the toxicological literature there is no general agreement about criteria for defining “similar action”, or about how strictly certain criteria should be applied (Miles et al. 1998). Sometimes, the induction of the same phenomenological effect is deemed sufficient for similar action. At the other extreme of the spectrum of opinions, an identical mechanism, involving the same active intermediate is required to fulfil the similarity assumption. A middle position is occupied by the view that interactions with the same site or tissue should qualify for similarity.

Given these difficulties, it was hard to decide *a priori* which prediction concept – *dose addition* or *independent action* – should be adopted for specific mixtures of endocrine disruptors. For example, the E-Screen assay exploits the principle that MCF-7 human breast cancer cells proliferate in the presence of chemicals that bind to, and activate the estrogen receptor. Importantly, the activation of signalling pathways independent of estrogen receptor binding also leads to mitogenicity (Silva et al. unpublished). If the criterion “induction of the same phenomenological effect” is applied, then all chemicals that induce cell proliferation could be deemed as similarly acting, and this would not only include estrogen receptor agonists. If, on the other hand, the more restrictive criterion of identical mechanisms is applied, only mixtures composed of, say, estrogen receptor agonists qualify as similarly acting and would justify application of *dose addition*. Even with an assay such as the YES the distinction between similar and dissimilar action is not straightforward. Some chemicals elicit positive effects in the YES in an indirect manner, e.g. by inducing metabolic conversions that yield estrogenic intermediates, or by interfering with anabolic pathways which could lead to the accumulation of estrogenic precursors. It is as yet unclear whether such agents would fulfil the assumptions of similar action.

Because of a lack of criteria for deciding *a priori* whether to apply *dose addition* or *independent action*, we have used both prediction concepts side-by-side for comparisons with experimentally observed effects.

Low dose combinations and statistical power

To prepare the ground for assessments of mixture effects in the low dose range, it became necessary to define ways in which low doses should be chosen. Several approaches have been discussed in the literature. The US-EPA and NIEHS have defined “low dose” as “doses below the range of no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) or lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL)” (NIEHS 2000). In the same publication, “low dose” was variously interpreted as a dose “...lower than typically used in EPA’s standard toxicity testing paradigm...” or taken in the sense of effect doses, as “...a biological change that occurs at environmentally relevant exposure levels...”.

As a first approximation, we have utilized doses equal to, or below, NOELs of individual test chemicals as our criterion for dose selection. However, to ensure that low dose mixture experiments were conclusive, we had to consider issues of statistical power. In combining chemicals at low doses, it was important to ensure that an anticipated combination effect was sufficiently large to reach statistical significance within the chosen experimental arrangement. At the same time, the precondition that no single mixture component should exceed its NOEL had to be met. Bearing in mind that the magnitude of a combination effect depends on factors such as number of mixture components, their concentration in the mixture, and the steepness of the dose-response curves of individual components (Drescher and Boedeker 1995), sufficiently large numbers of chemicals had to be combined at their NOEL. It would have been trivial to attempt an experiment where e.g. two agents were combined at individual NOAELs/100, or at “environmentally relevant” levels. The resulting mixture effect, although perhaps existent, would have been too small to reach the limits of experimental detectability.

Predictability - experimental results with mixtures of xeno-estrogens

Mixtures of estrogenic agents in the YES

The eight estrogenic chemicals listed in Figure 1 were selected for in-depth studies using the YES. They include plasticizers, such as bisphenol A, a number of 4-hydroxylated polychlorinated biphenyls, parabene, benzophenone and related compounds. The activation of the human estrogen receptor alpha (hER α) was studied in the YES assay. The assay utilises yeast cells genetically modified to harbour DNA coding for the hER α . ER activation becomes discernible in the presence of expression plasmids that carry estrogen response elements in tandem with the reporter gene *lac-Z*. Upon binding of the receptor-ligand complex to the estrogen response element on DNA, beta-galactosidase is expressed and secreted into the culture medium where it reacts with its substrate chlorophenol red beta-D-galactopyranoside to cause a colour change from yellow to red (Routledge and Sumpster 1996).

Figure 1 shows regression models of the eight chosen chemicals for estrogen receptor activation in YES. All agents were able to induce a maximal effect comparable to estradiol, but their potency varied by about three orders of magnitude. The concentration-response data of all single chemicals was used to predict the mixture effects that were expected to occur from additive combination effects of all eight chemicals. The combined effects were calculated for a large range of responses by using *dose addition* and *independent action*, and the predicted combination effects were then tested experimentally.

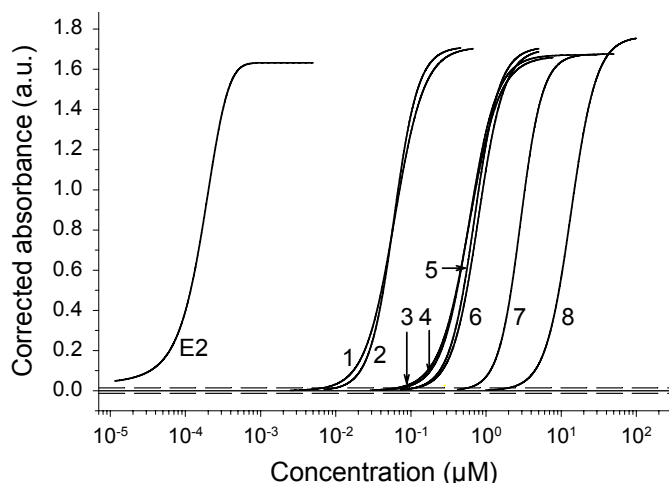


Figure 1: Regression models for the effects of eight xenoestrogens and of 17β-estradiol (E2) in the YES. The horizontal solid and dashed lines are the mean and 95% confidence interval of the mean of untreated controls (n=20). The numbering of the chemicals is as follows: 1: 2',3',4',5'-tetrachlorobiphenyl-4-ol, 2: 2',5'-dichlorobiphenyl-4-ol, 3: 4-chlorobiphenyl-4-ol, 4: genistein, 5: dihydroxybenzophenone, 6: benzyl-4-hydroxyparabene, 7: bisphenol A, 8: resorcinol monobenzoate.

As shown in Figure 2, the observed combination effects were in excellent agreement with the responses predicted by *dose addition*, for the entire range of effect levels. *Independent action* led to an underestimation of the observed mixture effects. Thus, it can be concluded that the joint effect of the eight chemicals is additive, according to *dose addition*. Similar results were obtained with mixtures of estradiol and 11 estrogenic agents (Rajakse et al. 2002). *Dose addition* provides an excellent tool for the prediction and assessment of combination effects of estrogenic chemicals in the YES (Silva et al. 2002).

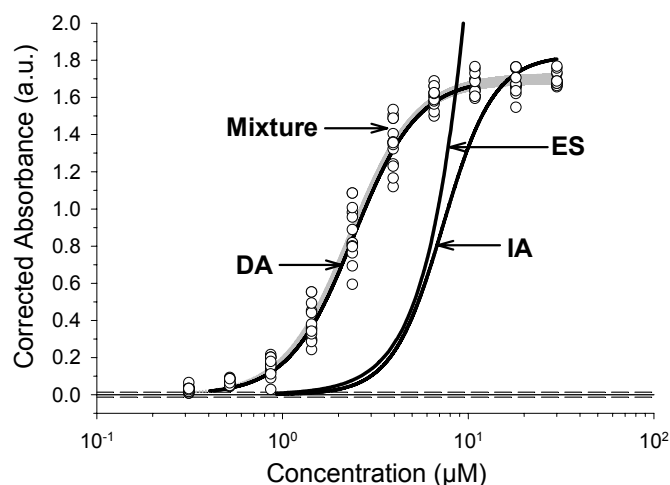


Figure 2: Predicted and observed effects in the YES of a mixture of the eight xenoestrogens shown in Figure 1. Experimental effect data (open circles) from three independent experiments, with the regression model and the upper and lower confidence limits of the best estimate of mean responses (shading). The solid line labelled DA shows the predicted combination effects derived from *dose addition*. The lines labelled IA and ES are the predictions derived from *independent action* and *effect summation*, respectively. The solid and dashed horizontal lines are the mean and 95% confidence interval of the mean of untreated controls (n=20).

Experiences with endocrine disrupter mixtures in the E-Screen

As already discussed, the E-Screen affords the possibility of extending the scope of studies from estrogen receptor agonists to a wider range of endocrine active chemicals. To explore the performance of *dose addition* and *independent action* in this assay, the effects of mixtures of two estrogen receptor agonists, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT, an antiandrogen, *p,p'*-DDE, and a chemical with cell proliferative effects by as yet poorly defined mechanisms, β -HCH, were analysed (Payne et al. 2001). *Dose addition* described the observed mixture effects of all four chemicals accurately, although *independent action* yielded predictions very similar to *dose addition* (Figure 3).

However, more recently we discovered deviations from the *dose addition* expectation with mixtures composed of estradiol, ethynylestradiol, genistein, bisphenol A, nonylphenol and octylphenol. The observed combination effects were considerably smaller than those anticipated by *independent action* and fell slightly short of the responses predicted by *dose addition* (Rajapakse et al. 2004). Comparing the EC50s of the mixture with predicted EC50s, there was a difference by a factor of approximately two between observation and prediction. Although these differences are too small to be of regulatory relevance, they may be important from a scientific point of view. Experimental or prediction errors were not likely to provide an explanation for this deviation, and this suggests that it might be result of interactions between certain mixture components, leading to weak antagonisms. This interpretation received empirical support with the demonstration that successive removal of nonylphenol and octylphenol from the mixture produced combination effects that were in good agreement with *dose addition* predictions. One possibility is that some chemicals in the mixture may induce steroid-metabolising enzymes. This may lead to more rapid removal of steroidal estrogens in the presence of these agents, with diminished overall effects as a result. This possibility is currently being tested experimentally in our group.

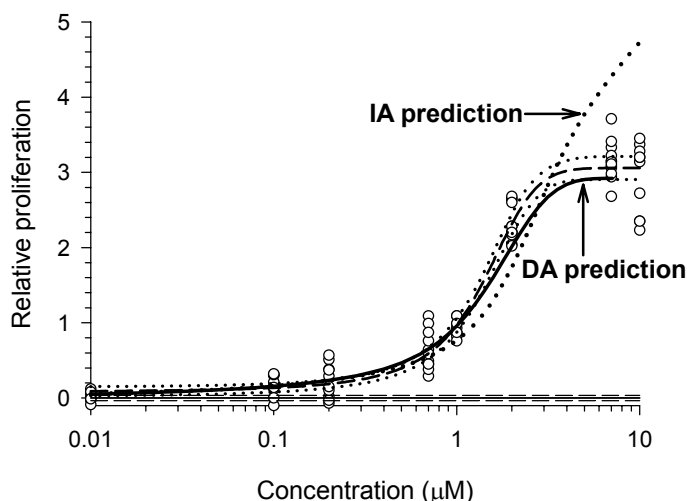


Figure 3: Predicted and observed mixture effects of a 1:1:1:1 (molar ratio) mixture of *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, β -HCH and *p,p'*-DDT in the E-Screen. Observed mixture effects are shown as grey circles and are triplicates from three independent experiments. Predicted effects were calculated using the models of *dose addition* and *independent action* and are shown as solid and dotted lines, respectively. The dashed curves are the best fit of the data to the regression model (Box-Cox-Logit function), and dotted lines are the upper and lower 95% confidence intervals of mean responses.

Taken together, our experiences show that *dose addition* provides fairly accurate predictions of combination effects of estrogenic chemicals. Recent evidence shows that the applicability of *dose addition* for estrogenic chemicals extends to *in vivo* assays. Experiments with five estrogenic chemicals in fathead minnows (*Pimephales promelas*) presented by Brian et al. (2005) also demonstrated good agreement between *dose addition* predictions and observed combination effects. It remains to be seen whether this also applies to other *in vivo* endpoints of a more apical nature. Work to address this is currently underway as part of the EU-funded EDEN project (www.edenresearch.info).

Mixture effects at low doses

We became interested in testing whether mixture effects would occur with estrogenic chemicals combined at levels below their individual NOELs. To assess this experimentally, statistical estimates of low effect doses had to be derived by regression analysis of dose response curves and by hypothesis testing techniques (Dunnett's test). Figure 4 displays the effects of the eight estrogenic agents examined earlier. It shows the responses that would have been observed, if they acted alone at levels equivalent to 40-90% of their NOEL. Although none of the eight agents would have produced statistically significant effects on their own, they provoked a substantial response when combined at these doses (Silva et al. 2002).

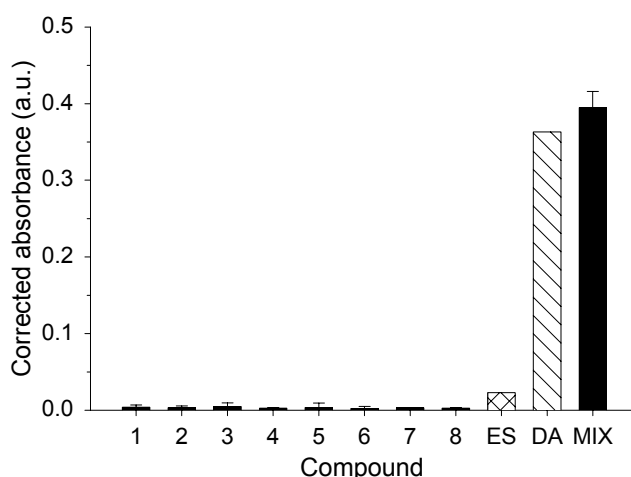


Figure 4: Effects of eight xenoestrogens at 40 – 90% of their NOEL in the YES. ES: *effect summation*, i.e. expected mixture effect obtained by calculating the arithmetic sum of individual effects of agents 1 - 8. DA: *dose addition* prediction. MIX: observed mixture effect. Error bars are upper 95% confidence limits of the best estimate of mean responses obtained by regression analysis. Numbering of the chemicals as in Figure 1.

Recently, similar observations were made with *in vivo* assays for estrogenicity. Tinwell and Ashby (2004) have analysed mixtures of eight estrogenic chemicals in the rat uterotrophic assay. Combinations of all agents at doses that gave statistically insignificant responses when tested individually, produced significant uterotrophic effects. Very recent mixture experiments with five estrogenic chemicals in fathead minnows (*Pimephales promelas*) presented by Brian et al. (2005) also demonstrated combination effects at concentrations that individually did not induce a significant response with vitellogenin induction as the endpoint.

However, would similar effects occur with combinations of weak xenoestrogens and potent steroidal estrogens? The question is of considerable relevance, because steroidal estrogens are present in human tissues at biologically active levels. This has led to the view that xenoestrogens pose no harm, because they are too weak to impact on the strong effects of the steroidal estrogens (Safe 1995, Sharpe 2005). To test these assumptions experimentally, we have prepared a “pool” of 11 xenoestrogens, each at levels below their NOEL, and combined this pool with various concentrations of estradiol. Figure 5 shows that the 11 xenoestrogens together were able to modulate significantly the effects of the hormone. When given individually, a response would not have been observable, yet jointly the 11 xenoestrogens nearly doubled the effect induced by the hormone.

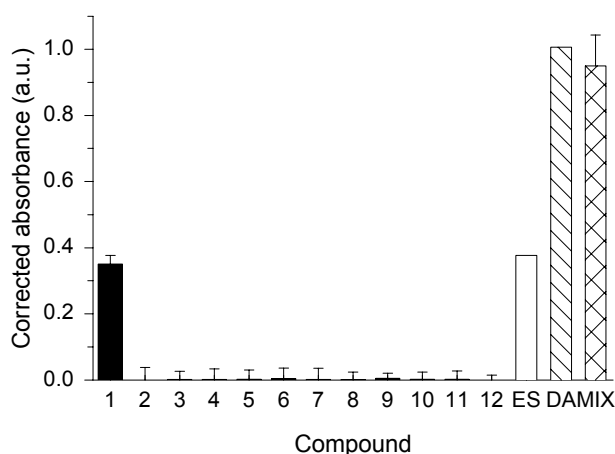


Figure 5: Modulation of the effects of estradiol by a combination of 11 xenoestrogens at 40-90% of their individual NOEL. Also shown are the predicted mixture effects calculated by using *effect summation* (ES – open bar) and *dose addition* (DA – hatched bar), as well as the observed mixture effect (MIX – cross-hatched). Error bars are the upper 95% confidence limit of responses. Numbering of the chemicals: (1) 17 β -estradiol, (2) 2',3',4',5'-tetrachlorobiphenyl-4-ol, (3) 2',5'-dichlorobiphenyl-4-ol, (4) 4'-chlorobiphenyl-4-ol, (5) genistein, (6) 2,4-dihydroxy-benzophenone, (7) benzyl-4-hydroxyparabene, (8) 2,3,4,5-tetra-chlorobiphenyl, (9) bisphenol A, (10) resorcinol monobenzoate, (11) 2,3,4-trichlorobiphenyl, (12) phenyl salicylate.

Taken together, there is now good evidence for the notion that estrogenic chemicals may produce combination effects at doses below NOEL. These findings provoke the question: Can mixtures of endocrine disrupters be considered safe?

When are endocrine disrupter mixtures safe?

As outlined in the introductory parts of this chapter, the concept of *dose addition* implies that every effective agent in the mixture, in any concentration, contributes, more or less, to the overall combination effect. Crucially, this also holds true when the individual doses are without effect. Thus, combination effects should also result from agents present at or even below effect thresholds, provided sufficiently large numbers of components sum up to a sufficiently high total effect dose.

This can be illustrated by considering a thought experiment. Let us assume that we are dealing with a large number of chemicals that by chance all exhibit the same dose-response curve, shown in Figure 6. Consider the small dose to the left, and let us assume further that the effect produced is too small to be distinguishable from untreated controls. To obtain the response expected from a combination of, say, 10 chemicals at this dose, we can simply move along the concentration axis and read off the effect corresponding to

a 10-fold higher dose. The procedure can be repeated with infinitesimally small doses – as long as there are sufficiently high numbers of chemicals present simultaneously, combination effects will result.

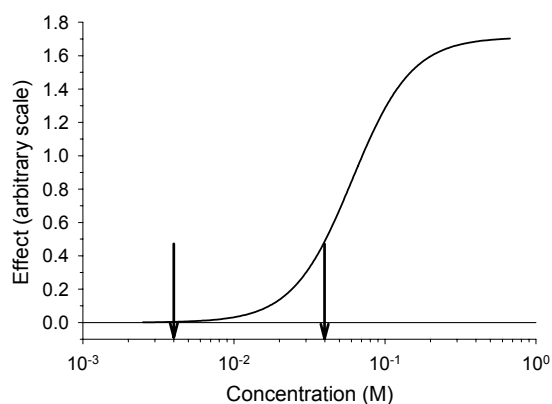


Figure 6: Illustration of a “sham” mixture experiment with chemicals that all exhibit the same dose response curve. At the low dose to the left (arrow, 4×10^{-3} M), the effect is hardly observable. A combination of ten agents, at this dose (total dose: 4×10^{-2} M) produces a significant combination effect, in line with expectations following *dose addition*.

This can be generalized by considering the mathematical features of *dose addition*. For a multi-component mixture of n chemicals the concept of *dose addition* states,

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{X_i}} = 1, \quad (1)$$

where c_i are the concentrations of the individual agents present in a mixture with a total effect of X , and EC_{X_i} are the concentrations of the single substances that produce the same effect X on their own.

Thus, if we demand that the total effect of a mixture should not exceed the response corresponding to its NOEL, then every component in the mixture must be present at a dose equal to $1/n$ its individual NOEL, n being the number of mixture components. With mixtures composed of large numbers of components this may well imply that not even Tolerable Daily Intake (TDI) values can be considered safe. A crucial determinant in deciding whether such mixtures are safe is knowledge about their numbers present in human tissues or the environment. It is this knowledge that is currently insufficient.

However, not all mixtures of endocrine disruptors may fulfil the assumptions of *dose addition*. Although an example has yet to be described in the literature, it is conceivable that the effects of certain mixtures of endocrine disruptors may be closer to *independent action*, for example when we are dealing with mixtures of estrogens and anti-androgens etc. As a scenario marking the extreme opposite of *dose addition* let us consider *independent action*. Under the assumption of *independent action* a mixture effect will not occur, if all components fail to induce an effect. Especially with mixtures composed of a very large number of components, this proposition forces clear distinctions between zero effects and small, albeit statistically insignificant effects. This becomes obvious from the mathematical formula describing *independent action*,

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i)) \quad (2)$$

where $E(c_{mix})$ is the effect observed with the mixture, and $E(c_i)$ the effect resulting from the i th mixture component, present at dose (c_i). Now consider the case of 100 chemicals, all present at zero effect levels. With equation (2), the expected mixture effect is

$$E_1 = 1 - [(1 - 0)^{100}] , \quad (3)$$

which indeed resolves to zero. If, however, these 100 chemicals all produce an effect of 1%, we obtain

$$E_2 = 1 - [(1 - 0.01)^{100}] , \quad (4)$$

which equals 0.63, or 63% of a maximally inducible effect. Should each of the 100 agents produce an effect of only 0.1%, the expected combined response will be 9.5%.

Thus, to rule out fairly large combination effects with multi-component mixtures, very small effects of the individual components need to be detected. However, with most *in vivo* bioassays it is near impossible to demonstrate reliably an effect of 1%, let alone effects smaller than 1%. To a large degree, the ability of an assay to resolve small effects depends on its inherent biological variability. With high variations in untreated controls, only relatively large effects become detectable. Linked to this is the number of observations that can be made in experiments. With 50 animals per dose group, long-term bioassays for carcinogenicity struggle to resolve a 10% cancer incidence (Casarett and Doull, 1986). Usually, effects of between 10 and 30% cannot be distinguished with certainty from control responses (Moore and Caux, 1997).

In view of these difficulties, it has long been acknowledged that doses of chemicals that indeed produce no effect, so-called no-effect-levels (NEL) (in the strict sense of zero effect levels) cannot be determined empirically. As a way out of this dilemma, and in acknowledgement of the limits of experimental observations, NOEL, and later NOAEL were introduced with the intention of providing an approximation of zero effect levels (Zbinden 1979). Since then, NOELs have become the linchpin of statutory chemicals risk assessment in the European Union. How reliable are NOELs as approximations of zero effect levels?

NOELs are not zero effect levels

We have carried out extensive dose-response studies in the low dose range, using the E-Screen. Figure 7 shows an example with the ubiquitous environmental chemical β -HCH.

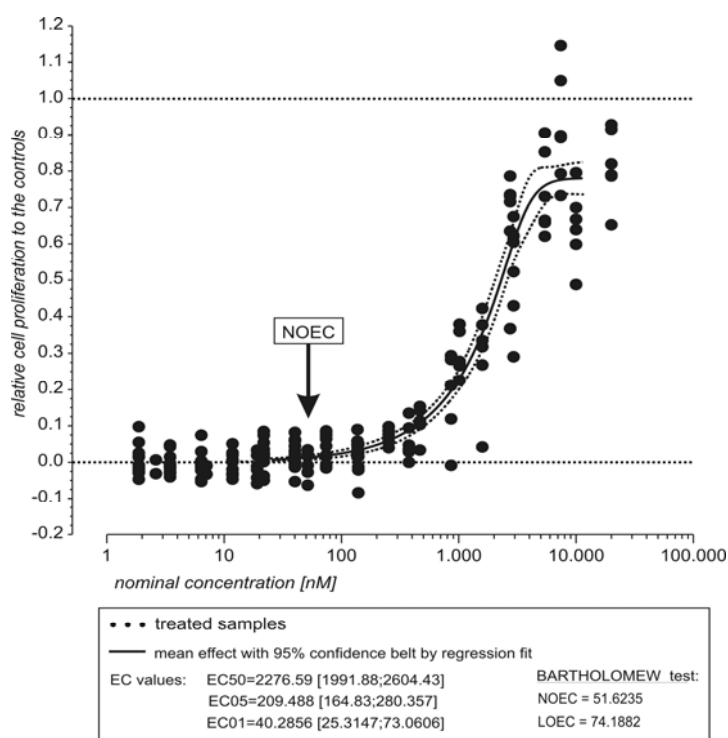


Figure 7: Dose-response analysis for β -HCH in the E-Screen. Experimental observations are shown as black circles, the regression model as a black line, with the upper and lower confidence limits depicted as dotted lines. Further explanations see text.

The highest tested concentration of β -HCH that failed to produce a statistically significantly different effect from controls (NOEL) was 50 nmole/L (Bartholomew's test, based on 23 concentrations with 6-12 replicates and 96 untreated controls). Does this mean that 50 nmole/L β -HCH is without any effects? The arithmetic mean effect of 0.4% associated with this concentration of β -HCH still indicates the presence of an effect larger than zero. This is further supported by the regression model fitted to the entire concentration-response data which estimates a response of 1.4% for 50 nmole/L β -HCH.

Similar studies with the antiandrogen finasteride in a one-generation reproductive toxicity experiment (endpoint: retained nipples in male offspring) showed that the NOAEL was associated with an effect of 8% (Hass unpublished).

Although familiar to statisticians (Chapman et al. 1996, Moore and Caux 1997), the notion that NOELs are not to be equated with true NELs may be confusing to others. Nevertheless, what is estimated as a NOEL depends to a large degree on the biological variation of the endpoint chosen for analysis, and the doses and number of replicates used. Figure 8 illustrates this with a typical concentration-response relationship obtained for vitellogenin induction in fish after exposure to an estrogenic chemical. In this example, there were 10 controls, and 10 fish for each chosen exposure concentration. Under these conditions, the NOEC can be estimated as 0.2 μ g/L (Figure 8a). All tested concentrations exceeding this level induced vitellogenin levels statistically significantly different from untreated controls. Now let us use the same biological data, but simply double them, so that there are now 20 fish per concentration, instead of 10 (Figure 8b). The increased statistical power afforded by the larger number of animals now leads us to estimate the next lower concentration, 0.13 μ g/L, as a NOEC. Crucially, the previous NOEC (0.2 μ g/L) has now become a lowest-observable-effect concentration (LOEC). Thus, NOECs (and NOELs) are hardly fixed

values. What appears to be without significant effect under specific experimental conditions may well turn out to induce responses when the statistical power of the experiment is improved.

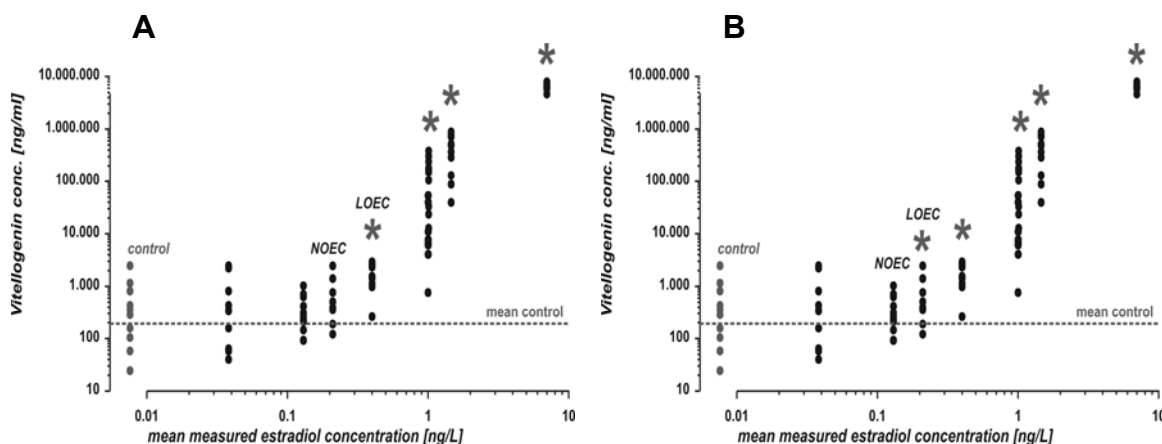


Figure 8: NOEC estimations with vitellogenin induction as an example. A: estimations based on ten observations, B: estimations based on a doubling of the data in A. Responses significantly different from controls are starred (Dunnett's test).

Therefore, the hypothesis testing techniques behind NOEL estimations cannot be taken to mean that NOELs are devoid of effects. At and below NOELs, effects may either be truly absent or remain undetected, due to lack of sensitivity. NOELs define a grey area, where the presence of effects can neither be proved, nor ruled out with confidence.

These considerations force the conclusion that thresholds in toxicology and pharmacology remain a concept whose existence cannot be proven empirically. Improved knowledge about mechanisms may suggest the existence of a dose "at the threshold between effect and no-effect", but the limitations defined by the "sensitivity" of the relevant experimental arrangements mean that no dosimetry, however refined, can establish such thresholds quantitatively.

Implications for risk assessment

Under the assumptions of both *dose addition* and *independent action* combination effects may result from endocrine disruptors if they are present in large numbers at levels equivalent to fractions of their individual NOELs. The possibility of combination effects from large numbers of endocrine disruptors is hard to rule out, irrespective of whether exposure is to similarly or dissimilarly acting agents.

However, the fact that joint effects cannot generally be ruled out gives little indication about the likelihood with which they might occur. To come closer to an answer in the endocrine disrupter arena, better knowledge about relevant exposure scenarios in terms of the nature of active chemicals, and their number, is essential. It is widely acknowledged that this information is at best fragmentary for most human exposure scenarios, but indications are that it may involve several hundred or more chemicals.

Perspectives for chemicals regulation

There can be no doubt that a change in the paradigms that govern human (and ecological) risk assessment is required, if humans and the environment are to be protected adequately from multiple exposures to endocrine disruptors. Risk assessment should recognize the limitations of the current chemical-by-chemical approach and embrace fully the reality of mixtures. There are encouraging signs of moves in this direction. In a recent opinion paper, the European Scientific Committee on Toxicology, Ecotoxicology and the Environment (SCTEE 2005) pointed out that *“for compounds with identical mode of action, such as oestrogenic hormones and xenoestrogens (...) the performance of individual risk assessments is problematic. ...The effects may be additive, especially since these chemicals co-occur in the aquatic environment”*.

Having acknowledged the relevance of effects from multiple exposures to endocrine disruptors, another task will be to develop concepts for the incorporation of mixture effects into the existing regulatory framework for chemicals. Although even a rudimentary review of regulatory options does not yet exist, some suggestions have been made. One proposal is to extend the toxicity equivalence factor concept developed for polyhalogenated dioxins and furans to estrogenic chemicals and other agents that can be conveniently grouped according to (presumed) modes of action. Another approach, discussed in the general context of mixture effects, would be to apply an additional uncertainty factor to take account of combined exposures. It remains to be seen whether, and to which extent, these suggestions prove viable for endocrine disruptors.

Acknowledgements and disclaimer

The work presented here was funded by the European Commission (Contracts EVK1-2001-0091 and QLRT-CT2002-00603).

The conclusions expressed in this chapter are those of the authors and do not necessarily reflect the policies or views of the Food Standards Agency.

Literature

- Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2000). Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ Toxicol Chem* 19:2341-2347.
- Arnold S, Klotz D, Collins B, Vonier P, Guilette Jr L, McLachlan J (1996). Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272:1489-1492.
- Ashby J, Lefevre PA, Odum J, Harris CA, Routledge EJ, Sumpter JP (1997). Synergy between synthetic oestrogens? *Nature* 385: 494.
- Bliss CI. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol* 26: 585-615.
- Brian JV, Harris CA, Scholze M., Backhaus T, Booy P, Lamoree M, Pojana G, Jonkers N, Runnals T, Bonfà A, Marcomini A, Sumpter JP (2005). Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect* 113: 721-728.
- Casarett LJ and Doull J (1996). *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons.* (Casarett LJ, Amdur MO, Klaassen, CD, Doull, J. Eds.), McGraw Hill.
- Drescher K and Boedeker W (1995). Concepts for the assessment of combined of substances: the relationship between concentration addition and independent action. *Biometrics* 51: 716-730.
- Hass U (personal communication)

- Hewlett PS and Plackett RL (1959). A Unified Theory for Quantal Responses to Mixtures of Drugs: Non-Interactive Action. *Biometrics* 15: 591-610.
- Loewe S, Muischnek H (1926). Über Kombinationswirkungen [in German]. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn-Schmiedebergs. Arch Exp Pathol Pharmacol* 114:313-326.
- Mileson BE, Chambers JE, Chen WL, Dettbarn W, Ehrich M, Eldefrawi AT, Gaylor DW, Hamernik K, Hodgson E, Karczmar AD, Padilla S, Pope CN, Richardson RJ, Saunders DR, Sheets LP, Sultatos LG, Wallace KB (1998). Common mechanisms of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol Sci* 41: 8-20.
- Moore CRJ, Caux PY (1997). Estimating low toxic effects. *Environ Toxicol Chem* 16: 794-801.
- NIEHS (2000) National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disrupters Low Dose Peer Review.
- Payne J, Scholze M, Kortenkamp A (2001). Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environ Health Perspect* 109: 391-397.
- Ramamoorthy K, Wang F, Chen I, Norris JD, McDonnell DP, Leonard LS, Gaido KW, Bocchinfuso WP, Korach KS, Safe S (1997). Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology* 138:1520-1527.
- Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A (2002). Combining xenoestrogens at levels below no-observed-effect-concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 110: 917-921.
- Rajapakse N, Silva E, Scholze M, Kortenkamp A (2004). Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. *Environ Sci Technol* 38: 6343-6352.
- Routledge EJ, Sumpter JP (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 15:241-248.
- Safe SH (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ Health Perspect* 103:346-351.
- SCTEE (2004) Specific recommendations of the Scientific Committee on Toxicology, Ecotoxicology and the Environment on "Two study reports on endocrine disrupters by WRc-NSF and BKH Consulting Engineers", in: Commission of the European Union, Commission staff working document on the implementation of the Community Strategy on Endocrine Disrupters. SEC (2004) 1372, Annex 4, Brussels.
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. (2002). Something from „nothing“ – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOEC's produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* 36: 1751-1756.
- Tinwell H, Ashby J (2004). Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens. *Environ Health Perspect* 112: 575-582.
- Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld ATC, Brunstrom B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FXR, Liem AKD, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern F, Zacharewski T (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 106: 775-792.
- WHO (1978) World Health Organisation. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals, Part 1. *Environmental Health Criteria* 6, Geneva.
- Yang RSH (1994) Introduction to the toxicology of chemical mixtures. In: RSH Yang (Ed) *Toxicology of chemical mixtures*, Academic Press, San Diego: 1-10.
- Zbinden G. (1979) The no-effect level, an old bone of contention in toxicology. *Arch. Toxicol.* 43: 3-7.

Quae nocent, docent: Vergleichende Untersuchung zur Wirkung endokriner Disruptoren im Tierreich

Schulte-Oehlmann, U.¹, Bachmann, J.¹, Candia Carnevali, D.², Janer, G.³, Jobling, S.⁴, Kloas, W.⁵, Kusk, O.⁶, Lavado, R.³, Lutz, I.⁵, Porte, C.³, Sugni, M.², Watermann, B.⁷, Wollenberger, L.⁶, Oehlmann, J.¹

¹Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Abteilung Ökologie und Evolution, Siesmayerstr. 70, D-60054 Frankfurt

²Universität Milano, Abteilung Biologie "Luigi Gorini", Via Caloria 26, I-20133 Milano

³CSIC Barcelona, Abteilung Umweltchemie, C/Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona

⁴Universität Brunel, Abteilung Biologie und Biochemie, Kingston Lane, UK-UB83PH Uxbridge

⁵ Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Binnenfischerei, Müggelseedamm 310, D-12587 Berlin

⁶ Technische Universität Dänemarks, Institut für Umwelt und Rohstoffe, Bygningstorvet 115, DK-2800 Lyngby

⁷ LimnoMar – Labor für Limnische/Marine Forschung und Vergleichende Pathologie, Bei der Neuen Münze 11, D-22145 Hamburg

Endokrin aktive Chemikalien – Das Problem

Eine Vielzahl von Chemikalien anthropogener Herkunft befindet sich in regelmäßiger Anwendung und wird somit in nicht unerheblichem Ausmaß in die Umwelt eingetragen. Vielen dieser Substanzen wird eine hormonähnliche Wirkung unterstellt bzw. für viele Stoffe wurde in tierexperimentellen Studien eine Wechselwirkung mit dem Hormonsystem nachgewiesen. Bedenkt man die Komplexität der endokrinen Systeme im Tierreich, ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten, auf welchen Ebenen eine endokrin aktive Chemikalie das „Signalsystem des Körpers“ in seiner Funktionsweise beeinträchtigen kann. Aus diesem Grund sind die zugrunde liegenden Wirkmechanismen oftmals nur schwer zuzuordnen.

Die Tatsache, dass sich eine große Anzahl von Chemikalien mit hormonmimetischer Wirkung im Bereich niedriger Dosierungen und Umweltkonzentrationen als biologisch aktiv erwiesen hat, liefert Grund zur Besorgnis, denn wissenschaftliche Studien bekräftigen, dass der traditionelle Leitsatz der Toxikologie „Die Dosis macht das Gift“ nicht in jedem Fall zutrifft, da einige Xenohormone hinsichtlich ihrer Wirkung nicht dem Muster von monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen folgen.

In Zeiten verbesserter Umwelt- und Industriestandards, der Anwendung innovativer Technologien mit dem Ziel, Substanzen mit möglichst geringer Persistenz in der Umwelt zu entwickeln, mag es zunächst abwegig erscheinen, darauf zu verweisen, wir seien mit einer neuen Gruppe problematischer Substanzen in der Umwelt konfrontiert. Lange vergessen sind die Eindrücke großer Umweltkatastrophen, verbunden mit dem Massensterben von Fischen, Wasservögeln oder wasserlebenden Säugetieren – solche Szenarien gehören in Europa mehrheitlich der Vergangenheit an. Seit geraumer Zeit verdeutlichen die Wasserzustandsberichte vieler EU-Länder einen generellen Trend: Der Status der Wasserqualität in Europa scheint sich zu verbessern (Nixon et al. 2003). Nicht vergessen sollte man jedoch, dass sich derartige Einschätzungen nicht auf den biologischen Status der Wasserqualität nach der neuen EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) beziehen.

In der heutigen Zeit sind problematische Schadstoffe nicht mehr zwangsläufig durch hohe Umweltkonzentrationen charakterisiert, sondern treten vielmehr im Ultraspurenbereich auf. In vielen Fällen sind selbst modernste analytische Techniken nicht so weit entwickelt,

um alle bedenklichen Substanzen in derart niedrigen Konzentrationsbereichen zu erfassen. Daughton und Ternes (1999) prägten den Begriff der "schleichenden Umweltgifte", wobei sie Endokrine Disruptoren, Pharmaka und Körperpflegemittel als integrale Bestandteile dieser Substanzgruppe identifizierten. Im Hinblick auf ihre allgemeine Verbreitung in der Umwelt, einer optimierten biologischen Aktivität und Effektivität in schon niedrigsten Konzentrationsbereichen, verfügen sie ganz offensichtlich über einige ähnliche Merkmale.

Ein Kennzeichen der Umwelthormone ist, dass sie chemisch nicht einheitlich charakterisierbar sind. So lassen sich in die Gruppe hormonell aktiver Substanzen diverse Verbindungen anthropogener und natürlicher Herkunft (z.B. Weichmacher, Pestizide, Alkylphenolethoxylate, Organozinnverbindungen, PCBs, Phytoöstrogene, natürliche Steroide, Pharmaka wie Ethinylöstradiol, Methyltestosteron, Trebolon) einordnen. Zudem zeichnet die endokrinen Modulatoren aus, dass ihnen eine große Bandbreite biophysikalischer Eigenschaften - von persistent bis hin zu leicht abbaubar, hydrophil zu lipophil und nicht-toxisch zu hochtoxisch - zugeordnet werden kann.

Auch bezüglich der mechanistischen Aspekte zur Wirkungsweise endokriner Disruptoren lassen sich keine einheitlichen Aktionsmuster beschreiben. Während sich einige Substanzen durch eine Bindung an den Rezeptor, nicht aber durch dessen Aktivierung (antagonistischer Effekt) auszeichnen, imitieren andere eine hormonelle Aktivität durch eine direkte Bindung an den Rezeptor (agonistischer Effekt). Indirekte, nicht-rezeptorvermittelte Wirkungen können aus der Bindung von Hormonmimetika an (Transport)proteine (z.B. CBG, SHGB, TBG, GHBP) und damit deren Blockade resultieren. Letzteres kann zu einer Steigerung oder auch Hemmung von Enzymaktivitäten führen. Auch eine Unterbindung oder Hemmung der Synthese endogener Hormone kann die Stoffwechselaktivitäten im Organismus beeinträchtigen.

Zudem gibt es eine Vielzahl von hormonproduzierenden Systemen im tierischen Organismus (Hypothalamus, Hypophyse, Schilddrüse, Thymus, Nebenniere, Pankreas bei den meisten Wirbeltieren - Corpora cardiaca, Corpora allata, Medulla accessoria der Insekten, X-Organ-Sinusdrüse, androgene Drüse bei Krebstieren). Die Mehrheit aller Publikationen hat jedoch vorwiegend die Betrachtung schädigender Einflüsse hormonell wirksamer Substanzen auf sexualsteroid-vermittelte Vorgänge der Fortpflanzung, sexuellen Entwicklung und Differenzierung zum Thema (Colborn et al. 1993; Duft et al. 2003; Jobling et al. 2004).

Endokrine Disruption stellt ein globales Phänomen dar. In allen Teilen der Welt wurde von hormonell gesteuerten Fehlfunktionen im Tierreich, verbunden mit Fortpflanzungsstörungen bis hin zum Niedergang von Populationen, berichtet (Candia Carnevali et al. 2001; Guilette et al. 1994; Kloas 2002; Lavado et al. 2004, Oehlmann et al. 1996). Die beschriebenen Effekte umfassen sowohl die Verweiblichung männlicher Individuen als auch der Vermännlichung weiblicher Tiere, die Schwächung von Schilddrüsen- und Immunfunktionen sowie die Störung von Entwicklungsvorgängen (de Fur et al. 1999).

Eindeutige Kausalbeziehungen zwischen der Exposition gegenüber einer Umweltchemikalie und einer androgenen Wirkung im Organismus wurde über die Beschreibung von Maskulinisierungseffekten weiblicher Vorderkiemerschnecken, verursacht durch Organozinnverbindungen, hergestellt (Bettin et al. 1996; Horiguchi et al. 1997, Oehlmann and Schulte-Oehlmann 2003). Am Beispiel der Vorderkiemerschnecken ließ sich nachweisen, dass Tributyl- und Triphenylzinnverbindungen Schlüsselenzyme des Sexualsteroidmetabolismus und damit endogene Hormonkonzentrationen der Tiere beeinflussten. Darüber hinaus konnte durch weitere Untersuchungen nachgewiesen werden, dass diese Substanzen auch bei anderen Taxa, einschließlich dem Menschen, in der Lage waren, ähnli-

che oder vergleichbare molekulare „Angriffsziele“ zu beeinträchtigen (Doering et al. 2002; Heidrich et al. 2001). Aus diesem Grund war es nahe liegend, den Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten im Rahmen des EU-Projektes COMPRENDO (Comparative Research on Endocrine Disrupters; www.comprendo-project.org) auf Substanzen zu legen, denen bei Mensch und Tier eine (anti-)androgene Wirkung unterstellt wurde. In diesem Zusammenhang zielt COMPRENDO auf die vergleichende Untersuchung potentieller Gesundheitsprobleme verursacht durch (anti-)androgenartige Hormonmimetika. Vor diesem Hintergrund sollen allgemeine Wirkprinzipien (anti-)androgener Verbindungen vor allem über die Analyse und Bewertung von Unterschieden und Gemeinsamkeiten auf der Effektebene bei Stellvertreterorganismen im Tierreich (von Nicht-Wirbeltieren bis zu den Wirbeltieren) aufgezeigt werden.

Testsysteme und Testsubstanzen

Im Rahmen des Projektes wurden über 20 Modellsysteme, wie diverse Vorderkiemerschnecken (*Marisa cornuarietis*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Nassarius reticulatus*), Krebstiere (*Acartia tonsa*, *Hyalella azteca*), Stachelhäuter (*Antedon mediterranea*, *Paracentrotus lividus*), Amphibien (*Xenopus laevis*), Fisch- (*Rutilus rutilus*, *Pimephales promelas*), Vogel- (*Gallus domesticus*), und Säugerspezies (*Rattus norvegicus*) sowie menschliche Zelllinien (MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3, PC-3, LNCaP-FGC, JEG-3, L56-Br-C1, Placenta-, Prostata-, Leberzelllinien) gegenüber 15 Testsubstanzen (Mono-, Di-, Tributylzinn, Triphenylzinn, Fenarimol, Vinclozolin, Linuron, Diuron, p,p'-DDE, Prochloraz, Methyltestosteron, Letrozol, Cyproteronacetat, Flutamid und native Umweltproben als Beispiel für komplexe Mischungen) bei durchschnittlich 5 Testkonzentrationen im Labor exponiert.

Endpunkte aus den Bereichen Vitalität (Gewicht, Wachstum, Sterblichkeit), Reproduktion (Geschlechterverhältnis, Reifegrad der Keimdrüsen, Größe der Sexualdrüsen und Geschlechtsorgane, Missbildungen, Vermännlichung weiblicher Tiere, Spermienbeweglichkeit und -qualität, Spermato- und Oogenesestörungen, Befruchtungserfolg, Anzahl produzierter Eier/Gelege, Gelegegröße, Regeneration), Entwicklung (Schlupferfolg, Larvalentwicklung, Zeit bis zur sexuellen Reife) und Physiologie (Sexualsteroid-Konzentrationen, Vitellogenin-Konzentrationen, Enzym-Aktivitäten, Apoptose, Proteingehalt) wurden, sofern anwendbar, bei allen Testmodellen hinsichtlich pathologischer Veränderungen analysiert.

Wirkungen und Effekte

Die Testorganismen wurden möglichst gegenüber identischen Testkonzentrationen exponiert; lediglich bei besonders sensitiven Arten mussten aufgrund der niedrigen Akuttoxizitätswerte die Konzentrationen z. T. niedriger gewählt werden. Alle Testmodelle wurden in semi-statischen Systemen (Ausnahme: *Pimephales promelas* im Durchflusssystem) exponiert. Die eingesetzten Nominalkonzentrationen der Testsubstanzen wurden in regelmäßigen Abständen chemisch-analytisch überprüft.

Nicht alle Resultate können hier dargestellt werden, so dass anhand einer exemplarischen Auswahl von Ergebnissen aus Triphenylzinn- und Fenarimol-Expositionsversuchen mit Schnecken, Krebsen und Stachelhäutern ein kurzer Überblick gegeben werden soll. Methyltestosteron diente bei diesen Versuchsreihen als Positivkontrolle.

Sowohl Triphenylzinn als auch Fenarimol werden in der Landwirtschaft als Pestizid mit fungizider Wirkung angewendet. Beiden Chemikalien wird, unter anderem, eine indirekte, nicht rezeptorvermittelte maskulinisierende Wirkung unterstellt, die auf die Hemmung der CytP450-abhängigen Aromatase zurückgeführt wird. Als Konsequenz wird letztlich die Produktion endogener Östrogene im Steroidmetabolismus beeinträchtigt. Im Organismus kommt es schließlich zu einer Erhöhung des Androgentiters und zumeist zu einer Verringerung des Östrogentiters.

Marisa cornuarietis (Mollusca: Gastropoda)

Die tropische Apfelschnecke *Marisa cornuarietis* besiedelt stehende bis mäßig turbulente limnische Gewässer (Süd-)amerikas, Afrikas und Asiens, ist jedoch mit den bei uns heimischen Sumpfdrehschnecken (Viviparidae) näher verwandt und, ebenso wie diese, getrenntgeschlechtlich.

In unseren Expositionsversuchen zeigte sich, dass weibliche Apfelschnecken unter dem Einfluss beider Testsubstanzen (sowie der Positivkontrolle) Anteile des männlichen Geschlechtssystems (Imposex) ausbilden (Abbildung 1). Bei der Virilisierung der Weibchen handelt es sich um eine graduelle Entwicklung, die sich bei *Marisa cornuarietis* in vier Stadien vollzieht. In Abbildung 1 ist die Entwicklung des Vermännlichungsparameters VDSI am Ende einer fünfmonatigen TPT- und Fenarimol-Exposition dargestellt. In den beiden höchsten Konzentrationsgruppen von 250 und 500 ng TPT-Sn/L bzw. von 1000 und 3000 ng Fenarimol/L kommt es zu einem signifikanten Anstieg des VDSI gegenüber der Kontrolle, nicht jedoch für die niedrigeren Konzentrationen. In den Expositionsversuchen konnten mit der Organozinnverbindung die höchsten VDSI-Werte, für die höchste Testkonzentration nahe dem Maximalwert von 3,0 bei dieser Art, induziert werden.

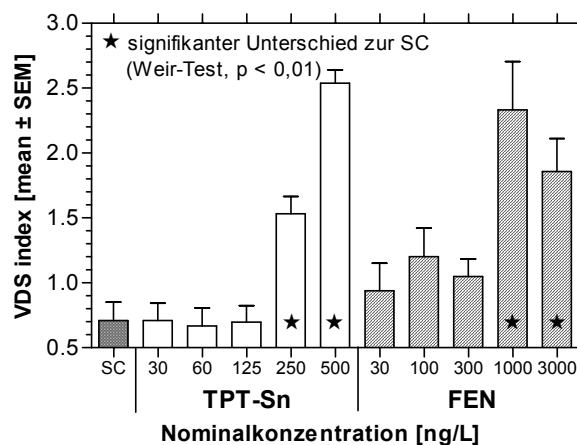


Abbildung 1. *Marisa cornuarietis*: VDSI bei TPT- und Fenarimol-Exposition.

Beide Testsubstanzen hatten ferner einen Effekt auf die Fruchtbarkeit der Apfelschnecke und führten in einem 5-monatigen Experiment zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Reduktion der Eizahl/Weibchen im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 2). Schon die geringsten eingesetzten Konzentrationen von jeweils 30 ng TPT-Sn und Fenarimol/L hatten einen signifikanten Effekt gegenüber der Kontrolle. Weibchen aus der höchsten TPT-Konzentrationsgruppe produzieren am Ende 70% weniger Eier und bei Fenarimol 60% weniger Eier als Weibchen aus der Kontrolle.

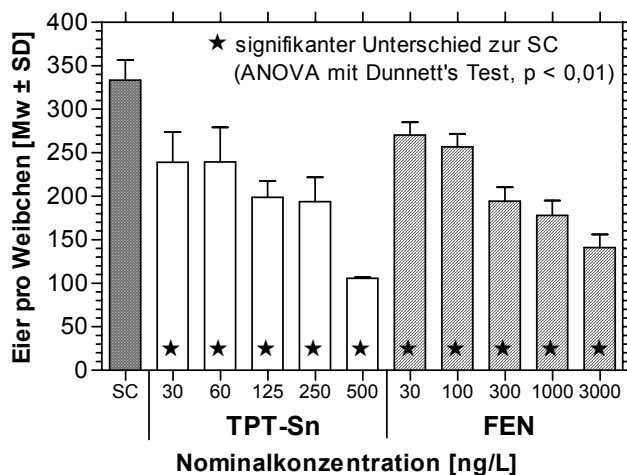


Abbildung 2. *Marisa cornuarietis*: Eizahl pro Weibchen bei TPT- und Fenarimol-Exposition.

Acartia tonsa (Arthropoda: Copepoda)

Bei *Acartia tonsa* handelt es sich um einen marinen und getrenntgeschlechtlichen Ruderfußkreb mit einer durchschnittlichen Länge von bis zu 1,2 mm. Bevor die Tiere das Adultstadium erreichen, durchlaufen sie eine komplexe Larvalentwicklung, die sechs Nauplien- und fünf Copepoditstadien umfasst und hormonell durch Ecdysterone, Juvenilhormone sowie Neuropeptide gesteuert wird. Die Normogenese ist bei dieser Art sehr gut dokumentiert. Es bietet sich daher an, den Einfluss von Testsubstanzen auf die Larvalentwicklung als endokrin regulierten Endpunkt zu überprüfen. Als Testparameter wird hierbei die LDR (Larval Development Ratio gemessen als Fraktion von Copepoditen gegenüber der Totalanzahl von Larven) ermittelt. Unter den für unsere Versuche gewählten Testbedingungen sind am fünften Tag der Entwicklung mindestens 50% der Kontrolltiere in ein Copepoditstadium übergegangen. Dieser Zeitpunkt ist optimal, um im LDR-Test eine Hemmung oder Beschleunigung der Larvalentwicklung exponierter Gruppen im Vergleich zur Kontrolle festzustellen, wobei vollständige Konzentrations-Wirkungsbeziehungen einschließlich effektiver Konzentrationen ermittelt werden.

Exponiert man *Acartia*-Eier gegenüber TPT, kommt es schon in der F0-Generation mit Zunahme der Biozidkonzentration im Umgebungswasser zu einer signifikanten Hemmung der Larvalentwicklung (Abbildung 3). Exponiert man im Life-Cycle-Test Eier der F1-Generation, d.h. Eier, die von Weibchen produziert wurden, welche selbst während ihrer gesamten Lebenszeit TPT ausgesetzt waren, ist dieser Effekt noch ausgeprägter, denn die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ist in Richtung niedrigerer TPT-Konzentrationen verschoben, was verdeutlicht, dass die Sensitivität der Filialgenerationen gegenüber der Testsubstanz zunimmt. In einem weiteren Experiment mit Fenarimol konnten wir für *Acartia tonsa* vergleichbare Effekte auf die LDR feststellen, wobei die Sensitivität der F1-Generation gegenüber der F0-Generation um den Faktor 10 erhöht war (Ergebnisse nicht dargestellt).

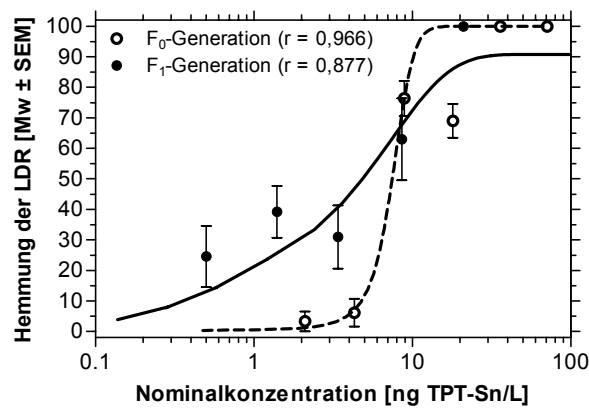


Abbildung 3. *Acartia tonsa*: Hemmung der Larvalentwicklung bei TPT-Exposition.

Antedon mediterranea (Echinodermata: Crinoidea)

Antedon mediterranea ist ein im Mittelmeer lebender Federstern (Crinoidea), zählt zu den Stachelhäutern und ist folglich mit den Seeigeln und Seesternen verwandt. Der Organismus besitzt federartige Ärmchen, mit denen er Nahrung aus dem Umgebungswasser filtern kann. Federsterne sind getrenntgeschlechtlich, ihre Geschlechtszellen sind im Bereich der Genitalpinnulae als besonders differenzierte Bereiche an den Armen lokalisiert. Als Schutz vor Fressfeinden sind sie in der Lage, sich ihrer Arme mitsamt der Keimzellen an Sollbruchstellen zu entledigen, diese aber später wieder zu regenerieren. Im Labortest kann man die Arme artifizuell amputieren und anschließend, über entsprechende Messungen, die Regenerationsfähigkeit der Tiere überprüfen. Diese außerordentliche Regenerationsleistung der Crinoiden wird auch für die vegetative Vermehrung genutzt und steht unter endokriner Kontrolle (Candia Carnevali 2004).

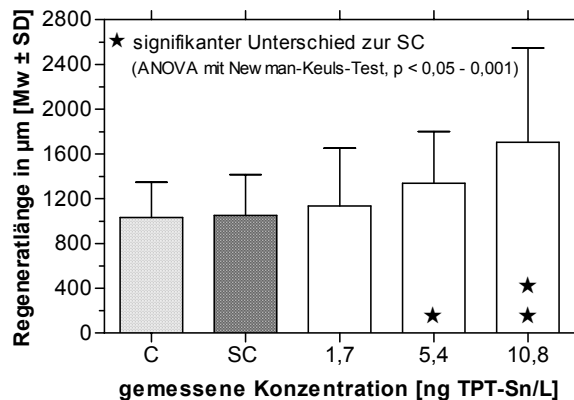


Abbildung 4. *Antedon mediterranea*: Regenerationslänge der Arme bei TPT-Exposition.

In einem vierwöchigen Experiment bewirkte eine Triphenylzinn-Exposition mit nominalen Konzentrationen von 125, 225 und 500 ng als Sn/L (entspricht den analytisch gemessenen Konzentrationen von 1,7, 5,4 und 10,8 ng TPT-Sn/L) bei den Tieren in den beiden höchsten Konzentrationsgruppen einen signifikant erhöhten Längenzuwachs an den amputierten Armregionen (Abbildung 4).

Begleitende Untersuchungen zeigten, dass die durch das Biozid induzierte erhöhte Proliferationsrate in den betroffenen Regionen mit Missbildungen, wie z.B. atypische Verkrümmungen und Verwachsungen an den Armen (Abbildung 5a-c), einhergingen.

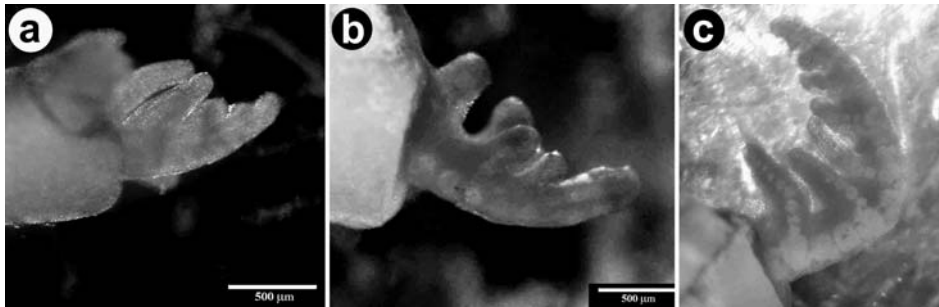


Abbildung 5. *Antedon mediterranea*: Regenerierte Armabschnitte im TPT-Expositionsexperiment. (a) Kontrolle, (b) 1,7 ng TPT-Sn/L, (c) 10,8 ng TPT-Sn/L.

Eine andere Form von Aberrationen, jedoch kein Einfluss auf den Längenzuwachs der Arme, konnte unter Fenarimol-Exposition beobachtet werden: Echinodermaten besitzen ein kalkiges Endoskelett, das bei erhöhten Fenarimol-Konzentrationen im Umgebungswasser der Tiere an "Knochendichte" verliert, bzw. nicht den Dichtegrad der Kontrolltiere erreicht (Abbildung 6). Die nachgebildeten Sklerite exponierter Tiere sind im Bau fragiler (Abbildung 6c), wobei die Kalkeinlagerungen im histologischen Präparat diffus erscheinen (Abbildung 6d), wenn sie mit den massiven Bildungen bei Kontrolltieren verglichen werden (Abbildung 6 a, b).

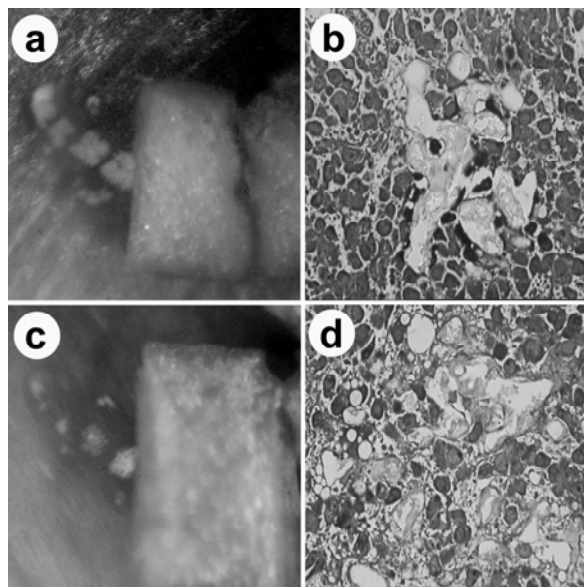


Abbildung 6. *Antedon mediterranea*: Regenerierte Armabschnitte im Fenarimol-Expositionsexperiment. (a) und (b) Kontrolle, (c) und (d) 300 ng Fenarimol/L.

Fehlbildungen dieser Art traten zumindest bei den beiden höchsten eingesetzten Expositionsgruppen signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe auf (Abbildung 7).

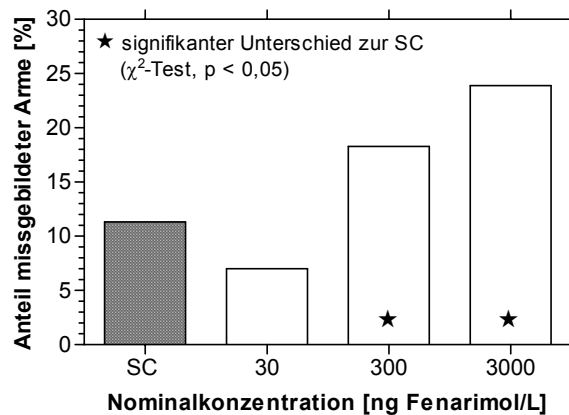


Abbildung 7. *Antedon mediterranea*: prozentualer Anteil an Missbildungen bei Fenarimol-Exposition.

Zusammenfassung

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse anhand von EC_{10} (fett), NOEC- und LOEC-Werten (Tabelle 1) für alle drei Arten unter Androgen-Expositionen verdeutlicht, dass:

- alle Testchemikalien zu signifikanten Effekten bei allen untersuchten Arten (*Mari-sa*: Imposex und Fekundität, *Acartia*: Inhibition der Larvalentwicklung, *Antedon*: Regeneration und Missbildungen,) führen;
- nicht alle Arten vergleichbar sensitiv gegenüber einer applizierten Testsubstanz reagieren. Während für Triphenylzinn für alle Arten EC_{10} und NOEC/LOEC-Werte in vergleichbaren Bereichen liegen, ergibt sich für Fenarimol ein anderes Bild. Hier erweist sich z.B. die Apfelschnecke mit einem EC_{10} -Wert von 31 ng/L als wesentlich sensitiver als der Ruderfußkrebs mit einer EC_{10} von im Minimum 5,5 µg/L.
- einzelne Endpunkte empfindlichere und weniger empfindliche Parameter darstellen – so ist z.B. die Fekundität bei der Apfelschnecke ein empfindlicherer Parameter als die Imposexentwicklung.

Tabelle 1. EC_{10} (fett), NOEC/LOEC-Werten in ng/L (gemessene Konzentrationen) bei den verschiedenen Testspezies.

Spezies/Endpunkt	TPT	Fenarimol
<i>M. cornuarietis</i> Imposex (VDSI)	15,9	31,0
<i>M. cornuarietis</i> Fekundität	2,48	11,4
<i>A. tonsa</i> Inhibition Larvalentwicklung	0,3 (F1)	5500 (F1)
<i>A. mediterranea</i> Regeneration	1,7/5,4	kein Effekt
<i>A. mediterranea</i> Missbildungen	1,7/5,4	30/300

Weitere physiologische Messungen ergaben, dass die Effekte der Testsubstanzen auf der entwicklungsbiologischen und reproduktionsbiologischen Ebene ebenfalls mit Änderungen im Steroidtiter und Aktivitätsmuster von wichtigen Schlüsselenzymen in der Sexualsteroidbiosynthese einhergingen (Janer et al., eingereicht). Durch kompetitive Verdrängungs-Assays ließen sich ferner für die untersuchten Invertebraten-Spezies *Marisa cornuarietis*, *Hyalella azteca*, *Paracentrotus lividus* und *Antedon mediterranea* androgen- und östrogenspezifische (für *H. azteca* nur androgenspezifische) Bindungsstellen nachweisen.

Damit ist natürlich nicht geklärt, ob es die den humanen ER und AR vergleichbaren Rezeptoren auch bei den von uns untersuchten Invertebraten gibt – für *Marisa cornuarietis* gelang jedoch die Sequenzierung eines östrogenspezifischen Bindungsäquivalents (Jobling et al. in prep).

Ausblick

Im Hinblick auf die Testung von Alt- und Neustoffen bezüglich einer endokrinen Wirkung können im Rahmen von COMPRENDO zwei der untersuchten Invertebraten-Spezies (*Acartia tonsa*, *Potamopyrgus antipodarum*) als OECD-Standardtests für die Chemikalien-testung vorgeschlagen werden. Der larvale Entwicklungs- und Reproduktionstest mit *A. tonsa* liegt im zweiten Entwurfstadium vor und ist mittlerweile in der Validierungsphase. *P. antipodarum* (Resultate hier nicht dargestellt) wurde von der „Ad hoc Expert Group On Invertebrate Testing“ der OECD als weiteres Testsystem in das „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disruptive Chemicals“ aufgenommen.

Die Standardisierung eines Reproduktions- und Entwicklungstests mit *Marisa cornuarietis* wäre ohne größere Probleme möglich, denn es handelt sich bei der Apfelschnecke um eine robuste Spezies, die sich im Labor einfach hält und reproduzieren lässt. *Marisa* hat sich in allen Experimenten als überaus sensitiv gegenüber Xenohormonen erwiesen; die Raumansprüche dieser Art sowie die Kosten der Experimentdurchführung liegen bei der Apfelschnecke jedoch um ein vielfaches höher als bei der Zwergdeckelschnecke (*P. antipodarum*).

Antedon mediterranea wie auch *Paracentrotus lividus* (Resultate hier nicht dargestellt) haben sich zwar für die Chemikalien-testung im Labor, nicht aber für die Entwicklung eines Standardtests zur routinemäßigen Erfassung hormoneller Wirkungen von Umweltchemikalien als geeignet erwiesen, da sich beide Arten im Labor nicht zur Fortpflanzung bringen lassen.

Literatur

- Bettin C, Oehlmann J, Stroben E (1996). TBT induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 50:299-317
- Candia Carnevali MD (2004). Regenerative response and endocrine disrupters in crinoid echinoderms: An old experimental model, a new ecotoxicological test. In: Matranga V (Hrsg.): *Echinodermata - Progress in Molecular and Subcellular Biology - Marine Molecular Biotechnology*. Springer-Verlag Heidelberg, 1-30
- Candia Carnevali MD, Galassi S, Bonasoro F, Patruno M and Thorndyke MC (2001). Regeneration and endocrine disrupters in crinoid echinoderms: Arm regeneration in *Antedon mediterranea* after experimental PCB exposure. *Journal of Experimental Biology* 204:835-842
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101: 378-384

- Daughton CG, Ternes TA (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107: 907-938
- de Fur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L (Hrsg.) (1999). Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing, and assessment. Proceedings of the Workshops on Endocrine Disruption in Invertebrates, 12-15 December 1998, Noordwijkerhout, The Netherlands. SETAC Press: Pensacola
- Doering DD, Steckelbroeck S, Doering T and Klingmüller D (2002). Effects of butyltins on human 5-alpha-reductase type 1 and type 2 activity. *Steroids* 67:859-87
- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M, Oehlmann J (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology* 64:437-449
- Guillette LJ JR, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 102:680-688
- Heidrich DD, Steckelbroeck S & Klingmüller D (2001). Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids* 66:763-769
- Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Morita M. (1997). Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environmental Pollution* 95:85-91
- Janer G, Bachmann J, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Porte C: The effect of organotin compounds on gender specific androstenedione metabolism in *M. cornuarietis* (eingereicht)
- Janer G, Lyssimachou A, Bachmann J, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Porte C: Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: The effect of xenoandrogenic compounds (eingereicht)
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Braunbeck T, Turner AP, Tyler CR (2004). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 66:207-222
- Kloas W. (2002). Amphibians as model for the study of endocrine disruptors. *International Review of Cytology* 216:1-57
- Lavado R, Thibaut R, Raldua D, Martin R, Porte C (2004). First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196:247-257
- Nixon S, Trent Z, Marcuello C, Lallana C (2003). Europe's water: An indicator-based assessment. European Environment Agency Copenhagen: Topic report number 1/2003
- Oehlmann J, Fioroni P, Stroben E, Markert B (1996). Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Science of the Total Environment* 188:205-223
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U. (2003). Endocrine disruption in invertebrates. *Pure and Applied Chemistry* 75:2207-2218

Neue Ergebnisse aus epidemiologischen Studien zur Fortpflanzungsgesundheit des Menschen

Pallapies, D.

BASF Aktiengesellschaft, GOA/C Product Stewardship, Carl-Bosch-Straße 38, 67056 Ludwigshafen

Einleitung

In den vergangenen Jahren wurde wiederholt diskutiert, ob es im Hinblick auf die Fortpflanzungsgesundheit des Menschen generell als ungünstig aufzufassende Trends gibt. Besondere Aufmerksamkeit erhielt in diesem Zusammenhang das sogenannte „Testicular dysgenesis syndrome“ (TDS), das nach einer Hypothese von Skakkebaek et al. (2001) eine zunehmend häufiger vorkommende Kombination folgender Störungen des Fortpflanzungssystems darstellt:

Hodenkrebs; Beeinträchtigung der Hodenentwicklung mit reduzierter Spermienzahl und -qualität; Kryptorchismus (Hodenhochstand); Hypospadien (Harnröhrenmissbildungen). Es wird erwogen, dass diesen Störungen ein gemeinsamer Ursprung während der Fetalperiode zugrunde liegt.

Darüber hinaus unterlag das Geschlechterverhältnis in den vergangenen Jahrzehnten geringfügigen Schwankungen. Ein eindeutiger Trend hin zu mehr Mädchen war jedoch bislang nicht zu erkennen. Außerdem wird diskutiert, ob die Pubertät bei Jungen und/oder Mädchen immer weiter vorverlegt wird. Als sicher kann durchaus gelten, dass im vergangenen Jahrhundert bis zumindest in die 60er oder 70er Jahre hinein es in vielen Regionen in Europa sowie auch in den USA im Durchschnitt zu einem früheren Einsetzen der Menarche gekommen ist. Ob sich dieser Trend danach weiter fortgesetzt hat, ist strittig. Marker der sexuellen Reifung sowohl bei Jungen als auch Mädchen in den vergangenen Jahrzehnten wurden zu wenig standardisiert erfasst, als dass eine eindeutige Aussage über Trends diesbezüglich möglich wäre.

Im Folgenden wird nur auf die verschiedenen Aspekte des TDS näher eingegangen.

Ein Ursprung der verschiedenen Aspekte des TDS in der Fetalzeit ist durchaus plausibel: So gibt es Hinweise darauf, dass es durch Störung der fetalen Entwicklung der Keimzellen zu einem In-situ-Karzinom kommen könnte. Eine Beeinträchtigung der Proliferation und Funktion der Sertolizellen könnte die Ursache für erniedrigte Spermienzahlen bzw. eine schlechtere Spermienqualität sein. Durch Hemmung der Entwicklung und Funktion der Leydigzellen vermittelter Androgen- und Insulin-like-Factor-3-Mangel könnten Hypospadien und Kryptorchismus begünstigt werden.

Hodenkrebs

Die Diagnostik des Hodenkrebses ist relativ zuverlässig. Der Hodenkrebs zeigt eine ausgeprägte Altersabhängigkeit mit einem Altersgipfel in der Gruppe der 20 bis 40-jährigen, in der er der häufigste bösartige Tumor ist. Fehldiagnosen kommen kaum vor; die Krebsregister sind oft nahezu komplett in Bezug auf diese Tumorart. Nicht auszuschließen ist, dass die Vollständigkeit der Krebsregister allerdings in den vergangenen Jahrzehnten zunahm; offensichtliche Trends werden dadurch aber nur in geringem Maße beeinflusst. Es besteht deshalb kein Zweifel, dass die Häufigkeit des Hodenkrebses in vielen Industrie-

ländern bereits seit ca. 1920 angestiegen ist. Dabei handelt es sich um einen sog. Geburtskohorten-Effekt; d.h. eine deutliche Zunahme ist erkennbar in Abhängigkeit vom Geburtszeitpunkt (-jahr). In der früheren DDR kam es beispielsweise von 1970 bis 1989 ca. zu einer Verdopplung der altersstandardisierten Inzidenz des Hodenkrebses auf 8/100.000/Jahr (s. auch www.krebsregister.saarland.de/publikationen/PDF/KID2004.PDF). Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts setzte sich ein vergleichbarer Trend in Deutschland auch danach zumindest bis ca. 1998 fort. Demgegenüber ist die Mortalität in Deutschland seit den 70er Jahren deutlich rückläufig und liegt seit Mitte der 80er Jahre unter einem Fall/100.000/Jahr.

Innerhalb Europas gibt es deutliche Unterschiede in der Hodenkrebs-Inzidenz. 1995 war sie in Dänemark fast zehnmal so hoch wie in Litauen (siehe Tab. 1 nach Richiardi et al. 2004).

Tabelle 1. Jährliche Veränderungen in der Hodenkrebs-Inzidenz in Europa

	Jährliche Veränderung in %			Inzidenz in 1995 (pro 100.000)
	Gesamtbeobach- tungszeitraum	vor 1990	nach 1990	
Dänemark	2,6	2,8	-0,3	15,0
Norwegen	3,0	3,0	2,9	11,3
Schweden	3,2	3,3	2,5	8,6
Estland	3,2	3,2	3,1	5,3
Finnland	3,9	3,8	4,6	3,0
Polen	4,3	-	-	2,6
Lettland	4,2	3,0	5,3	2,3
Litauen	4,9	-	-	1,6

Insgesamt ist in fast allen europäischen Ländern von einem deutlichen Anstieg um im Mittel ca. 3 % pro Jahr auszugehen. Auffällig dabei ist, dass dieser Anstieg in Dänemark, dem Land mit der höchsten Inzidenz über dem Gesamtbeobachtungszeitraum am geringsten war und es seit 1990 zu einem Stillstand bzw. sogar leichten Rückgang der Hodenkrebsinzidenz gekommen ist. Bergström et al. haben bereits in einer 1996 erschienenen Publikation darauf hingewiesen, dass es in den skandinavischen Ländern Dänemark, Norwegen und Schweden bereits für die ab 1920 Geborenen zu einem Anstieg des Hodenkrebsrisikos kam. In diesen Ländern setzte sich der Anstieg allerdings über die folgenden Jahrzehnte nicht gleichmäßig fort; für die Geburtsjahre 1930 bis ca. zum Ende des zweiten Weltkriegs war nämlich kein weiterer Anstieg, im Gegenteil sogar eine geringe Abnahme, zu erkennen. Eine solche Unterbrechung des Trends lassen die Daten für Ostdeutschland, Finnland und Polen nicht erkennen: Dort kam es für die seit Mitte der 20er Jahre bis zu den 70er Jahren Geborenen zu einem kontinuierlichen, deutlichen Anstieg.

Diese geographischen Unterschiede könnten Hinweise auf mögliche Risikofaktoren für den Hodenkrebs geben; bislang ist es allerdings nicht gelungen, entsprechende Erklärungen zu finden. Gesicherte Risikofaktoren für den Hodenkrebs stellen Kryptorchismus und Subfertilität dar. Daneben gibt es mehr oder minder deutliche Hinweise, dass mütterliches Rauchen, der Geburtsrang, eine vorzeitige Geburt oder ein niedriges Geburtsgewicht, eine frühe Pubertät, eine hohe Körpergröße, viel Sitzen oder der Verzehr von Fetten oder Milch(-produkten) mit dem Hodenkrebs assoziiert sein könnten. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Studie von Pettersson et al. (2004), die eine deutliche Assoziation der Hodenkrebs-Inzidenz bei Männern im Alter von 20 bis 34 Jahren mit der Prävalenz

des Rauchens der 25 bis 29 Jahre alten Frauen der 28 Jahre zuvor geborenen Generation in den skandinavischen Ländern Dänemark, Norwegen, Schweden und Finnland beobachteten. In dem Land, in dem die meisten Frauen rauchten, nämlich Dänemark, war auch die Hodenkrebs-Inzidenz in der Generation ihrer Söhne am höchsten. Vieles deutet darauf hin, dass für den Hodenkrebs frühe Expositionen besonders relevant sind: Wie bereits betont, weist der Hodenkrebs einen frühen Inzidenzgipfel auf; es bestehen Hinweise auf eine In-utero-Genese von In-situ-Hodenkarzinomen; das Risiko ist mit der Geburtskohorte assoziiert; bei Migrationsstudien zeigt es sich, dass das Risiko des Herkunftslandes unabhängig vom Alter erhalten bleibt; Kryptorchismus ist ein bekannter Risikofaktor für Hodenkrebs.

Dennoch gibt es für den Hodenkrebs eine Reihe offener Fragen: Warum ist die Inzidenz in Dänemark bereits zu Beginn des 20. Jh. viel größer als in anderen Ostseeanrainerregionen? Warum ist vom Anfang der 30er bis Anfang der 40er Jahre der Anstieg in skandinavischen Ländern zum Stillstand gekommen? Warum ist eine Stagnation/ein Rückgang in Dänemark mit den Ende der 70er Jahre Geborenen eingetreten? Warum ist der prozentuale Anstieg in Dänemark am geringsten? Warum ist der zeitliche Verlauf bei Seminomen und Nicht-Seminomen trotz unterschiedlicher Altersgipfel vergleichbar?

Spermienparameter

Longitudinale und geographische Vergleiche gemessener Spermienparameter sind insbesondere für die vergangenen Jahrzehnte aufgrund mangelnder Standardisierung bzw. unzureichender Berücksichtigung verschiedenster Einflussfaktoren nur sehr eingeschränkt möglich. Bei allen derartigen Studien ist darauf zu achten, wie repräsentativ die Studienteilnehmer für die Gesamtbevölkerung sind. Die Dauer sexueller Abstinenz ist ein Faktor, der alle Spermienparameter sehr deutlich beeinflussen kann und deshalb möglichst konstant sein sollte. Entscheidend ist, dass sowohl bei Probengewinnung als auch bei der Analyse eine Standardisierung und Qualitätskontrolle erfolgt. Noch sind in Bezug auf die Spermienparameter relevante Fragen ungeklärt: Was ist der adäquate Endpunkt (Gesamtzahl, Konzentration, Morphologie, Beweglichkeit, Kombinationen)? Ab welchem Wert wird die Fertilität in einer Population/im Individuum beeinträchtigt? Welches statistische Maß ist am sinnvollsten (Median, Mittelwert, absolute Zahl oder relativer Anteil unterhalb eines Schwellenwertes)?

Bislang lässt sich eindeutig feststellen, dass es zum Teil sehr deutliche geographische Unterschiede sowohl in Europa als auch in den USA gibt. Als Beispiel seien die medianen Spermienkonzentrationen junger Männer in den folgenden fünf nordischen Ländern angeführt: Dänemark und Norwegen: 41 Mio/ml; Finnland: 54 Mio/ml; Estland: 57 Mio/ml; Litauen: 55 Mio/ml (Jørgensen et al. 2005).

Es sieht bislang nicht so aus, als sei es global zu einem Rückgang oder zu einer Verschlechterung der Spermienparameter gekommen; in einzelnen Ländern bestehen einerseits Hinweise auf eine Abnahme, andererseits Hinweise für eine konstante Zahl bzw. sogar eine Zunahme der Spermienzahlen wie auch der Spermienqualität. Erst die neueren qualitativ hochwertigen Studien werden es ermöglichen, Aussagen über die Richtigkeit solcher Trends zu machen. Als Beispiel sei hier die Arbeitsgruppe von Skakkebaek angeführt, die bei Rekruten in Dänemark in der Tat relativ niedrige Spermienzahlen fanden, die allerdings keine weitere Tendenz zur Abnahme in von 1996 bis 2004 jährlich untersuchten Kohorten gleichen Alters feststellen konnten.

Auch für die Spermienparameter gibt es Hinweise, dass das Rauchen während der Schwangerschaft einen negativen Einfluss haben könnte: Als Beispiel sei die Untersuchung von Kold Jensen et al. (2004) angeführt, die 1.770 Männer im Alter von 16 bis 27 Jahren in Dänemark, Norwegen, Finnland, Litauen und Estland untersuchten. Dabei wurde bei den in utero gegenüber mütterlichem Rauchen exponierten Männern eine um 24,5 % erniedrigte gesamte Spermienzahl im Vergleich mit Männern beobachtet, deren Mütter während der Schwangerschaft nicht rauchten (Abb. 1).

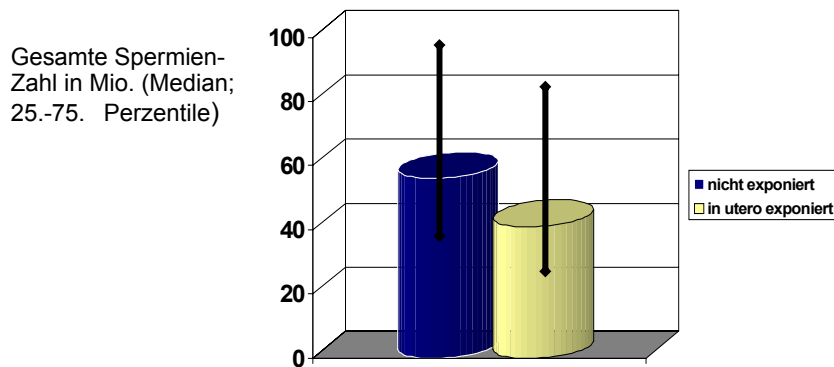


Abbildung 1. Gesamte Spermienzahl von Männern (16 - 27 Jahre; Dänemark, Norwegen, Finnland, Litauen und Estland) von in der Schwangerschaft rauchenden und nicht rauchenden Müttern (nach Kold Jensen et al. 2004)

Kryptorchismus / Hypospadien

Die bis in die 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts vorliegenden Daten zu diesen Fehlbildungen sind aufgrund folgender Probleme kaum zu interpretieren: Standardisierte diagnostische Kriterien fehlen häufig. Dies zeigt sich bei den Hypospadien darin, dass eine Differenzierung nach Schweregraden nur sehr selten erfolgte. Beim Kryptorchismus ist entscheidend, in welchem Alter die Diagnosestellung erfolgt. Daneben wurden sowohl Kryptorchismus als auch Hypospadien in vielen Ländern nur unvollständig registriert. In vielen Untersuchungen wurden die Daten zu diesen beiden Endpunkten erst retrospektiv erfasst. Obwohl es sich hierbei um die häufigsten Fehlbildungen bei Jungen handelt, ist aufgrund der Prävalenz im bzw. unter dem Prozentbereich eine ausreichende Power nur bei Auswertung größerer Populationen/Regionen vorhanden. Die Abhängigkeit der Prävalenz des Kryptorchismus vom Alter bei der Untersuchung ist aus der Abb. 2 ersichtlich: Die Prävalenz des Kryptorchismus bei der Geburt betrug 9 % in Dänemark und 2,4 % in Finnland, während im Alter von drei Monaten die Prävalenzen 1,9 bzw. 1,0 % betragen.

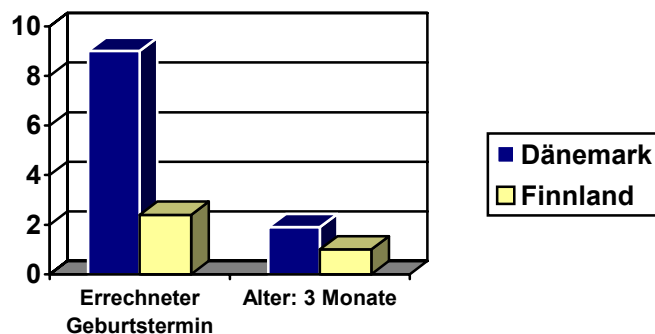


Abbildung 2. Abhängigkeit der Prävalenz des Kryptorchismus vom Alter bei der Untersuchung (nach Bolsen et al. 2004)

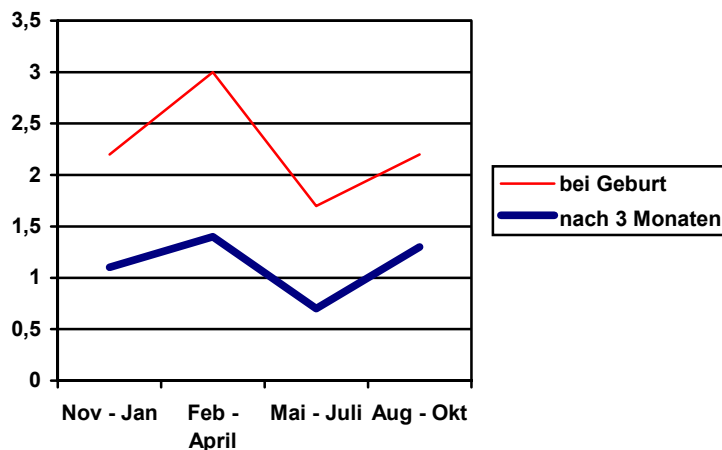


Abbildung 3. Abhängigkeit des Kryptorchismus von Jahreszeit und Zeitpunkt der Untersuchung (nach Kaleva et al. 2005)

Demgegenüber zeigt die Abb. 3 die Abhängigkeit des Kryptorchismus von der Jahreszeit und von dem Zeitpunkt der Untersuchung auf. In der 1997 bis 2001 in der Region Turku in Finnland durchgeführten Studie war die Prävalenz des Kryptorchismus bei Geburt über das gesamte Jahr hindurch ca. doppelt so hoch wie im Alter von drei Monaten. Es ist allerdings eine deutlich höhere Prävalenz für die im Februar bis April Geborenen und eine deutlich niedrigere Prävalenz für die von Mai bis Juli Geborenen erkennbar.

Der europäische Chemieverband CEFIC hat Untersuchungen zum Kryptorchismus und Hypospadien in der Region Rotterdam und in Schweden finanziell unterstützt. Pierik et al. (2002, 2005) führten standardisierte Untersuchungen während des ersten Arztbesuches bei 95 % aller 7.652 neugeborenen Jungen über zwei Jahre in der Region Rotterdam durch. Dabei ergab sich eine Prävalenz von Kryptorchismus von 1,2 % bei einem medianen Alter von 35 Tagen. Das entspricht 89 von 7.292 Jungen. In einer nachuntersuchten Untergruppe mit einem medianen Alter von 95 Tagen war der Kryptorchismus noch in 69 % vorhanden. Für Hypospadien fand sich eine Prävalenz von 0,73 %. Das entspricht 53 von 7.292 Jungen. Betrachtet man nur die Lebendgeborenen, so beträgt die Zahl 38 auf 10.000; wenn man die glandulären Hypospadien nicht einbezieht, sind es nur 26 auf 10.000. Das Verhältnis dieser leichten gegenüber den schwereren Fällen ist somit 0,3. Pierik et al. (2004) fanden dabei Assoziationen beider Fehlbildungen mit suboptimalem mütterlichen Gesundheitszustand, niedrigem mütterlichem Bildungsstand und türkischer Abstammung. Kryptorchismus war mit vorzeitiger Geburt sowie mit väterlicher Pflanzenschutzmittel-Exposition assoziiert. Dabei ist zu betonen, dass die Erfassung der Pflanzenschutzmittel-Exposition mit großen Unsicherheiten behaftet war. Es handelt sich um rein qualitative retrospektive Angaben im Wesentlichen der Mütter (je nach Expositionsmaß 5 bzw. 6 Fälle gegenüber Pflanzenschutzmitteln exponiert.) Niedriges Geburtsgewicht und väterliches Rauchen waren nur mit Hypospadien assoziiert. Insgesamt ist zu diesen Assoziationen festzustellen, dass hiermit mögliche Hinweise auf weiter zu untersuchende Faktoren gegeben werden, eine kausale Beziehung aber keinesfalls gesichert ist.

Die in Schweden durchgeführte Studie (Ekbohm, präsentiert auf dem CEFIC LRI-Workshop, 2004) ergab ähnliche Prävalenzdaten: Für den Kryptorchismus lag der Wert bei ca. 1 %, für Hypospadien bei 0,2 bis 0,4 %. Dabei fand sich eine mögliche positive Assoziation mit dem mütterlichen Body-mass-index.

Während die Assoziationen zwischen Kryptorchismus, Hodenkrebs und beeinträchtiger Spermienzahl und -funktion einen Zusammenhang im Sinne eines TDS für durchaus möglich erscheinen lassen, sind die Hinweise für eine Zugehörigkeit der Hypospadien zu diesem Syndrom deutlich weniger ausgeprägt.

Dafür spricht, dass Hypospadien ähnliche Risikofaktoren aufweisen - wie Geburtsrang, niedriges Geburtsgewicht bzw. Gestationsalter, mütterliche Blutungen, Kaiserschnitt, Leistenhernien. Nationale Prävalenzzahlen für Hypospadien sind im Allgemeinen schwer vergleichbar; es ist allerdings bislang weniger klar erkennbar, dass in solchen Ländern, in denen die anderen drei Endpunkte des TDS beeinträchtigt sind, auch Hypospadien häufiger vorkommen.

Gegen eine Zugehörigkeit der Hypospadien zum TDS spricht, dass kaum Hypospadien und Kryptorchismus im selben Individuum vorkommen, dass es z.B. bei Kryptorchismus, aber nicht bei Hypospadien Hinweise für eine saisonale Abhängigkeit gibt. Es scheint auch eher so zu sein, dass bei einer In-utero-Exposition gegenüber Diethylstilböstrol keine Häufung von Hypospadien vorkommt. Vor allem bei schwereren Fällen von Hypospadien gibt es Hinweise auf eine größere Relevanz genetischer Faktoren als bei den anderen drei genannten Endpunkten des TDS.

Empfehlungen im Hinblick auf zukünftige epidemiologische Untersuchungen

Aufgrund der unzureichenden Datenlage kann als einzig gesicherter Trend im Hinblick auf die verschiedenen Aspekte des TDS nur der deutliche Anstieg der Hodenkrebs-Inzidenzen seit den 20er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gelten. Die Ursachen für diesen Trend sind bislang ebenso unklar wie die Gründe für das Auftreten der o.g. Störungen überhaupt. Eine kausale Rolle für in der Umwelt vorkommende Konzentrationen chemischer Substanzen konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Um über die mögliche Bedeutung dieser wie auch anderer Faktoren Aufschluss zu gewinnen, hat die Arbeitsgruppe Endocrine Disrupters im Rahmen der von der europäischen Kommission begründeten SCALE-Initiative (Science, Children, Awareness raising, Legal instruments, Evaluation) folgende Empfehlungen abgegeben:

Integration und Harmonisierung existierender nationaler Aktivitäten zu Monitoring und Datenerfassung; Fokussierung der Forschung beim Biomonitoring auf Langzeit-/In-utero-Expositionen; Etablierung von klaren diagnostischen Kriterien und Surveillancesystemen; Priorisierung verdächtiger Substanzen inklusive natürlicher, synthetischer und pflanzlicher Hormone; Aufbau eines Monitorsystems (gute Qualität, standardisierte Daten); Identifizierung von "Hotspots of exposure / effects".

Als besonders relevant wurde die Etablierung großer Mutter-Kind-Kohorten betrachtet: Neben reproduktiven Effekten / endokrin aktiven Substanzen ist dabei die Erfassung von z. B. immunologischen/neurologischen Wirkungen und Risikofaktoren wie Ernährung, Lärm, Genetik, Lebensstil, sozioökonomischer Status wichtig.

Gegenwärtig wird bereits eine Reihe von Studien an Geburtskohorten durchgeführt, die auf der Internetseite <http://www.birthcohorts.net> vorgestellt werden.

Literatur

Bergström R, Adami H-O, Möhner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Akre O, Hakulinen T (1996). Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst* (88):727-733

- Bolsen K A, Kaleva M, Main K M, Virtanen H E, Haavisto A-M, Schnidt I M, Chellakooty M, Damgaard I N, Mau C, Reunanen M, Skakkebaek N E, Toppari J (2004), Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* (363):1264-1269
- Jørgensen N, Asklund C, Carlsen E, Holm M, Skakkebaek N E. (2005) Recent studies on semen quality of Nordic populations – worrying low semen quality among young Danish men. 3rd Copenhagen Workshop on Environment, Reproductive Health and Fertility. Abstract book:25
- Kaleva M, Virtanen H E, Haavisto A-M, Main K M, Reunanen M, Skakkebaek N E, Toppari J (2005). Circannual rhythm in the incidence of cryptorchidism in Finland. *Int J Androl* (28):53-57
- Kold Jensen T, Jørgensen N, Punab M, Haugen T B, Suominen J, Zilaitiene B, Horte A, Andersen A-G, Carlsen E, Magnus Ø, Matulevicius V, Neramo I, Vierula M, Keiding N, Toppari J, Skakkebaek N E (2004). Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: a cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five European countries. *Am J Epidemiol* (159):49-58
- Pettersson A, Kaijser M, Richiardi L, Askling J, Ekblom A, Akre O (2004). Women smoking and testicular cancer: one epidemic causing another? *Int J Cancer* (109):941-944
- Pierik F H, Burdorf A, Deddens J A, Juttman R E, Weber R F A (2004). Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. *Environ Health Perspect* (112):1570-1576
- Pierik F H, Burdorf A, de Muinck Keizer-Schrama S M P F, Wolffenbuttel K P, Rien Nijman J M, Juttman R E, Weber R F A (2005). The cryptorchidism prevalence among infants in the general population of Rotterdam, the Netherlands. *Int J Androl* (28):248-252
- Pierik F H, Burdorf A, Rien Nijman J M, de Muinck Keizer-Schrama S M P F, Juttman R E, Weber R F A (2002). A high hypospadias rate in the Netherlands. *Human Reproduction* (17):1112-1115
- Richiardi L, Bellocco R, Adami H-O, Torrang A, Barlow L, Hakulinen T, Rahu M, Stengrevics A, Storm H, Tretli S, Kurtinaitis J, Tyczynski J E, Akre O (2004). Testicular cancer incidence in eight Northern European countries: secular and recent trends. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention* (13):2157-2166
- Skakkebaek N E, Rajpert-De Meyts E, Main K M (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* (16):972-978

EU Studie über die Ejakulatqualität junger Männer in Hamburg und Leipzig

Salzbrunn, A.¹, Paasch, U.², Koch, P.³, Flesch-Janys, D.³, Glander, H.-J.², Schulze, W.¹

¹Abteilung für Andrologie, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf

²Abteilung für Andrologie, Universität Leipzig

³Arbeitsgruppe Epidemiologie der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit und des Instituts für medizinische Biometrie und Epidemiologie IMBE/UKE (Prof. Dr. J. Berger), Hamburg

Einleitung

In verschiedenen andrologischen Abteilungen in Deutschland konnten seit Jahren niedrige Spermatozoenkonzentrationen der Patienten beobachtet werden. Die Werte sind dabei in den letzten Dekaden geburtskohortenabhängig und kontinuierlich gesunken (Licht, 1998; Thierfelder et al., 1999; Paasch et al., 2003). Internationale retrospektive Studien bestätigten diese Befunde (Carlsen et al., 1992; Irvine et al., 1996). Ob diese Daten aber auf die männliche Allgemeinbevölkerung in Deutschland übertragbar sind, ist bislang unklar. Ebenso ist unbekannt, ob und inwieweit die Ejakulatqualität der heutigen jungen Männer in Ost- und Westdeutschland durch unterschiedliche Lebensbedingungen und Belastungen in der Kindheit beeinflusst wurde.

Methoden

Anlässlich der Musterungsuntersuchung wurden 504 junge Männer in Hamburg (als Modell für Westdeutschland) und 500 junge Männer in Leipzig (als Modell für Ostdeutschland) untersucht. Der Untersuchungsgang folgte dabei dem Protokoll vorangegangener europäischer Studien (Jorgensen et al., 2002). Zufällig wurden in Hamburg 34 Männer untersucht, die in Ostdeutschland geboren wurden und innerhalb der ersten Lebensjahre nach Hamburg umzogen (O/W-Gruppe). Deren Daten wurden gesondert erfasst.

Mittels Fragebogen wurden anamnestische Parameter erfasst, und es erfolgte eine körperliche Untersuchung. Außerdem wurden Blutproben entnommen und ein Ejakulat abgegeben. Die Ejakulatanalyse wurde gemäß den Richtlinien der WHO (1999) vorgenommen, jedoch modifiziert nach einer Studie von Jorgensen et al. (1997) über Labordifferenzen. Es wurden externe und interne Qualitätskontrollen durchgeführt. Da die Blutanalysen und die statistische Auswertung der Fragebögen und der Ejakulatabefunde noch nicht abgeschlossen sind, sind die angegebenen Werte Rohdaten und vorläufig.

Ergebnisse

Ein Leistenbruch mit 9,7% und der Hodenhochstand mit 9,5% waren im Gesamtkollektiv die am häufigsten berichteten Vorerkrankungen. Krampfadern am Hoden, Vorhautverengung oder Harnröhrentzündungen traten seltener auf, andere Erkrankungen nur in Einzelfällen. Details und statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zentren in Hamburg und Leipzig zeigt Tabelle 1.

Der Anteil rauchender Probanden betrug 57,8% im Gesamtkollektiv, der Median des Alkoholkonsums lag bei 66 g/Woche. Drogen wurden von 22,9% der Probanden konsumiert, es fanden sich dabei deutliche Unterschiede zwischen Hamburg (35,8%) und Leipzig (14,1%). Von den Eltern rauchten während der Schwangerschaft der Mutter mit den Probanden 14,3% der Mütter und 42,2% der Väter, auch hier zeigten sich Unterschiede (Hamburg 21,6% rauchende Mütter und 50,5% rauchende Väter, Leipzig 9,7% rauchende Mütter und 36,8% rauchende Väter). Details hierzu zeigt Tabelle 2.

Der Median der Spermatozoenkonzentration betrug im Gesamtkollektiv 46 Mio/ml (5%-95% Intervall, 16-162 Mio/ml). Die Werte für in Hamburg Geborene (n=335) und die der Probanden aus Leipzig (n=475) betragen 48,2 Mio/ml und 44,5 Mio/ml. In der O/W-Gruppe lag der Median der Spermatozoenkonzentration bei 53,2 Mio/ml.

Die Ejakulatvolumina betragen 2,8 ml im Gesamtkollektiv, 3,1 ml in Hamburg, 2,5 ml in Leipzig und 3,4 ml in der O/W-Gruppe. Es resultierten Spermatozoenzahlen pro Ejakulat von 124 Mio (Gesamtkollektiv), 142,5 Mio (Hamburg), 111,4 Mio (Leipzig) und 141,3 Mio (O/W-Gruppe). Die Kollektive wiesen bezüglich der Ejakulatvolumina und der Spermatozoenzahl pro Ejakulat statistisch signifikante Unterschiede auf ($p < 0,05$). Der Anteil motiler Spermatozoen lag im Gesamtkollektiv bei 72,7%, in Hamburg bei 66,7%, in Leipzig bei 82% und in der O/W-Gruppe bei 67,4% ($p < 0,05$). In der elektronenoptischen Ejakulatanalyse (EM) lag der Anteil normal geformter Spermatozoenköpfe bei 4% im Gesamtkollektiv (Hamburg 5%, Leipzig 4%, O/W-Gruppe 4%) (Tabelle 3).

In der multivariaten Regressionsanalyse zeigte sich, dass der Konsum von Alkohol oder Drogen keinen negativen Effekt auf die Spermatozoenkonzentration hatte, wohl aber das Rauchen des Probanden selbst und das Rauchen der Mutter während der Schwangerschaft mit dem Probanden. Auch fand sich ein negativer Einfluss, wenn im Kindesalter länger als 2 Jahre Windeln getragen wurden. Ebenfalls waren saisonale Schwankungen zu verzeichnen, mit im Frühling niedrigeren Spermatozoenkonzentrationen verglichen mit den anderen Jahreszeiten. Von früheren Erkrankungen oder medizinischen Behandlungen hatte nur die Behandlung des Kryptorchismus einen negativen Einfluss auf die Spermatozoenkonzentration.

Eine höhere Spermatozoenkonzentration hingegen fand sich mit zunehmender sexueller Karenz, zunehmender Hodengröße und bei Probanden mit Abitur verglichen mit anderen Schulabschlüssen (Tabelle 4).

Tabelle 1: Frühere medizinische Behandlungen

Median	Gesamt	Hamburg	Leipzig	O/W-Gruppe	p<0,05*
%	n=844	n=335	n=475	n=34	
Leistenbruch	9,7	7,8	11,2	8,8	
Hodenkrampfader	3,6	6,9	1,3	2,9	*
Hodenhochstand	9,5	14	6,5	5,9	*
Vorhautverengung	2,5	6	0	2,9	*
Harnröhrenentzündung	1,2	2,7	0	2,9	*

* Chi² Test / Fisher Exact Test

Tabelle 2: Lebensgewohnheiten

Median	Gesamt	Hamburg	Leipzig	O/W-Gruppe	p<0,05*
	n=844	n=335	n=475	n=34	
Anteil rauchender Probanden, %	57,8	57,2	58,2	58,8	
Alkoholkonsum der Probanden, g/Woche	66	66	66	58	
Anteil Drogen konsumierender Probanden, %	22,9	35,8	14,1	17,6	*
Rauchen der Mutter in der SS mit Probanden, %	14,3	21,6	9,7	9,1	*
Rauchen des Vaters in der SS mit Probanden, %	42,2	50,5	36,8	42,4	*

*Chi² Test / Fisher Exact Test

Tabelle 3: Ejakulatanalysen

Median	Gesamt	Hamburg	Leipzig	O/W-Gruppe	p<0,05
	n=844	n=335	n=475	n=34	
Volumen, ml	2,8	3,1	2,5	3,4	*
Spermatozoenkonz. Mio/ml	46	48,2	44,5	53,4	
Spermatozoen/Ejakulat Mio	124	142,5	111,4	141,3	*
Motilität % A+B+C	72,7	66,7	82	67,4	*
EM Morphologie % normale Köpfe	4	5	4	4	

*Chi² Test / Fisher Exact Test

Tabelle 4: Einflüsse auf die Spermatozoenkonzentration (p < 0,05)

negativ	positiv
Behandlung des Hodenhochstands	sexuelle Karez
Rauchen des Probanden	höherer Schulabschluss
mütterliches Rauchen in der SS	Hodengröße
Gebrauch von Lösungsmitteln	
Tragen von Windeln > 2Jahre	
Untersuchung im Frühling	

Diskussion

Die vorliegende Studie soll modellhaft einen Überblick über die reproduktive Funktion von jungen Männern in Deutschland geben. Angenommen, die Probanden können als repräsentativ für die entsprechenden Altersgruppen in Ost- und Westdeutschland gelten, zeigte sich, dass die Spermatozoenkonzentration im europäischen Vergleich im unteren bis mittleren Bereich lag (Jorgensen et al., 2002). Es zeigte sich aber auch, dass die niedrigen Patienten-

werte aus andrologischen Abteilungen nicht die Situation der jungen Männer in Deutschland spiegelten (Licht, 1998; Thierfelder et al., 1999; Paasch et al., 2003).

Die Probanden in Hamburg und Leipzig unterschieden sich nicht hinsichtlich der Spermatozoenkonzentration, aber bei den Ejakulatvolumina und resultierend bei den Spermatozoenzahlen pro Ejakulat. Worauf dies zurückzuführen ist, ist bislang unklar. Als negative Einflussfaktoren auf die Spermatozoenkonzentration konnten z.B. das Rauchen und die vorangegangene Behandlung eines Hodenhochstands identifiziert werden. Dies bestätigte frühere europäische Untersuchungen (Skakkebaek et al., 2001).

Es sollte jetzt angestrebt werden, ergänzend fertilitätsrelevante Gene der Probanden zu analysieren und die Befunde mit den bereits erhobenen Daten zu korrelieren. So kann ein Gesamtbild geschaffen werden, das äußere Einflussfaktoren auf die Ejakulatqualität junger Männer vor deren genetischem Hintergrund darstellt. Da die Studie über die Ejakulatqualität junger Männer in Deutschland zunächst nur eine Momentaufnahme darstellt, ist es insgesamt sicher wünschenswert, die Untersuchungen zu wiederholen, um die vorhandenen Daten zu ergänzen, einen möglichen Trend zu erfassen und, falls notwendig, präventiv tätig zu werden.

Literatur

- Carlsen, E., Keiding, N. and Skakkebaek, N. E. (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med. J.*, **305**, 609-613.
- Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., Macdonald, E. and Aitken, J. (1996) Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Br. Med. J.*, **312**, 467-471.
- Jorgensen, N., Auger, J., Giwercman, A., Irvine, D.S., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Le Bon, C., Macdonald, E., Pekuri, A.M. et al. (1997) Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *Int. J. Androl.*, **20**, 201-208.
- Jorgensen, N., Carlsen, E., Nermoen, I., Punab, M., Suominen, J., Andersen, A-G., Andersson, A-M., Haugen, T., Horte, A., Jensen, T., Magnus, O., Petersen, J., Vierula, M., Toppari, J., Skakkebaek, N. (2002) East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod.*, **17**, 2199-2208.
- Licht, M., (1998) Retrospektive Untersuchung der zwischen 1956 und 1995 in der Abteilung für Andrologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf erhobenen Spermiogramme. *Universität Hamburg, FB Medizin*, 192 S.
- Paasch, U., Thieme, C., Glander, H.-J., (2003) Men born in the region of Leipzig (Saxony, Germany) between 1960 and 1970 showed a significantly decreased sperm count (examination of 3432 individuals) *Andrologia*, **35**, 375-377.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De, M.E. and Main, K.M., (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.*, **16**, 972-978
- Thierfelder, W., Seher, C., Dortschy, R. und Engel, S., (1999) Abnahme der Spermaqualität bei gesunden Männern aus ungewollt kinderlosen Partnerschaften. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, **42**, 471-478.
- World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge, Cambridge University Press.

Effekte im Niedrigdosisbereich - eine Herausforderung für die Risikobewertung von Chemikalien

Chahoud, I.

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Garystr. 5, 14195 Berlin

Die Produktion und Verwendung industrieller Chemikalien ist in den vergangenen 50 Jahren nahezu exponentiell angestiegen. Zurzeit werden täglich ca. 10 neue Chemikalien auf den Markt gebracht. Während dieser Zeitspanne konnte ein signifikanter Anstieg von Entwicklungsstörungen beim Menschen beobachtet werden, welcher mit der Exposition gegenüber Chemikalien, die in der Umwelt persistieren, in Zusammenhang gebracht wird. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse verschiedener epidemiologischer Studien gestützt, in welchen eine signifikante Korrelation zwischen einigen Störungen und Krankheiten beim Menschen (z.B. verminderte Zeugungsfähigkeit beim Mann, Anstieg neurologischer Entwicklungsstörungen bei Kindern) und dem Vorkommen bestimmter Umweltkontaminanten, wie z.B. DDT, Blei, Quecksilber oder PCBs, festgestellt wurde. Dieser Vortrag konzentriert sich auf die Umweltsubstanzen, die eine schilddrüsenhormon-ähnliche Wirkung besitzen. Es wurden Ein-Generationsstudien mit PCB 118 sowie den Polybromierten Diphenylethern (PBDE) 99 und 47 bei Ratten durchgeführt. Nachfolgend wird exemplarisch auf die Wirkung von PBDE 99 auf die Muttertiere und ihre Nachkommen eingegangen. Das Flammschutzmittel PBDE ist eines der persistierenden Chemikalien, welches im Laufe der letzten Jahrzehnte in zunehmender Konzentration in biologischen Proben aus der Umwelt gefunden wurde und daher ein Gesundheitsrisiko darstellen kann. PBDE werden auf Grund ihrer hervorragenden Feuer abweisenden Eigenschaften in großen Mengen in verschiedenen industriell gefertigten Materialien verwendet und kommen daher ubiquitär in der Umwelt vor. Experimentelle Studien an Nagern weisen darauf hin, dass diese Substanzklasse eine breite Spanne an toxischen Eigenschaften besitzt. So wurden bei Labortieren Effekte auf den Schilddrüsenhormonhaushalt, auf Enzyme des hepatischen Stoffwechsels und auf das Verhalten beschrieben. Es existiert jedoch nur wenig Information über mögliche Effekte auf Reproduktion und prä- oder postnatale Entwicklung. Die Exposition während kritischer Phasen der Organogenese und die Empfindlichkeit des sich entwickelnden Organismus gegenüber geringen Veränderungen des Hormonhaushalts kann zu lang anhaltenden und oft permanenten Effekten führen, die als „organisational effects“ bezeichnet werden.

In der Studie wurden verschiedene Aspekte zur Toxizität des Kongeners PBDE 99 bei der Ratte untersucht. Hierfür wurden Dosierungen verwendet, die sich im Bereich der Konzentrationen bewegte, denen Menschen in der Umwelt ausgesetzt sind. Es wurden zwei Experimente durchgeführt, in welchen trächtige Wistar Ratten per Schlundsonde an Tag 6 der Trächtigkeit einmalig mit 60 µg und 300 µg PBDE 99/kg Körpergewicht behandelt wurden. In Experiment I wurden die Gewebekonzentrationen von PBDE 99 und die Wirkung auf den Schilddrüsenhormonstatus während der Laktationsperiode untersucht. Im Fettgewebe der Muttertiere wurden hohe Konzentrationen an PBDE nachgewiesen, die den Schluss zulassen, dass eine beachtliche Menge der Substanz über die Muttermilch an die Nachkommen weitergegeben wird. Der Nachweis signifikanter Konzentrationen an PBDE 99 in Leber und Fettgewebe der Nachkommen noch ca. 37 Tage nach der Behandlung der Muttertiere zeigt, dass dieses Kongener eine hohe Persistenz besitzt. Darüber hinaus zeigte die Untersuchung der toxikokinetischen Eigenschaften von PBDE 99, dass der diaplazentare Übergang vom Muttertier auf die Nachkommen sehr effektiv zu sein scheint, da hohe Konzentrationen der

Substanz in Leber und Fettgewebe der Nachkommen bereits am ersten Lebenstag gemessen werden konnten. Weiterhin kam es bei den Muttertieren zu Anfang der Laktation zu einer Verminderung der Konzentration von Thyroxin (T4) im Blut.

Ziel von Experiment II war es, mögliche Langzeiteffekte, die während der Pubertät und des Erwachsenenalters auftreten können, zu untersuchen. Um mögliche Schilddrüsenhormonvermittelte Effekte bestimmen zu können, wurde eine zusätzliche Gruppe als Positivkontrolle von Tag 7 bis Tag 21 der Trächtigkeit mit der goitrogenen Substanz 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) über das Trinkwasser in einer Konzentration von 5 mg/Liter behandelt.

In Experiment II kam es zu lang anhaltenden Verhaltensänderungen bei den Nachkommen. Die Tiere zeigten unter Verwendung einer robusten Methode zur Messung der basalen lokomotorischen Aktivität, nach prä- und postnataler (via Muttermilch) Exposition gegenüber 300 µg PBDE 99/kg Körpergewicht an PND 36 eine Hyperaktivität, die auch während der Pubertät (PND 71) noch bestehen blieb. In der Gruppe, die gegenüber 60 µg PBDE 99 exponiert war, zeigten die Nachkommen nur während der Pubertät erhöhte Aktivität. Die bei Ratten beobachteten Effekte stützen die These, dass Umweltgifte eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Verhaltensstörungen bei Kindern spielen können.

Nach prä- und postnataler Exposition gegenüber PBDE 99 kam es zu persistierenden Effekten auf das Reproduktionssystem der männlichen Nachkommen. Im Erwachsenenalter zeigten sich bei den Tieren leichte Gewichtsveränderungen an den Fortpflanzungsorganen, die von einer signifikanten Verringerung der Spermien- und Spermatidenanzahl sowie der täglichen Spermienproduktion begleitet wurden.

Die Ergebnisse der Untersuchung können wie folgt zusammengefasst werden:

- Die Messungen der Gewebekonzentrationen weisen darauf hin, dass die Nachkommen sowohl im Mutterleib als auch während der Laktationsperiode gegenüber PBDE 99 exponiert waren.
- Der Schilddrüsenhormonhaushalt nach Exposition gegenüber PBDE 99 war bei den Muttertieren verändert.
- Die während der Entwicklung exponierten Nachkommen waren hyperaktiv. Dieser Effekt blieb bis zur Pubertät bestehen.
- Im Erwachsenenalter zeigte sich bei den männlichen Nachkommen eine Beeinträchtigung des Reproduktionssystems, die durch eine verringerte Spermatogenese deutlich wurde.

Diese Untersuchung kann zur Risikobewertung von PBDE 99 für den Menschen beitragen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass PBDE 99 bei der Ratte in Dosierungen, die nahe der Umweltbelastung mit dieser Substanz liegen, für den sich in der Entwicklung befindenden Organismus eine Gefährdung darstellt. Daher können, in Bezug auf den Menschen, ungeborene Kinder als eine Subpopulation angesehen werden, für die die Exposition gegenüber PBDE ein Gesundheitsrisiko darstellt. Ein weiterer Aspekt dieser Untersuchung ist die Verteilung der Substanz im Gewebe. Toxikokinetische Untersuchungen sind wichtig für die Risikoabschätzung für den Menschen und werden in Studien zur Entwicklungs- und Reproduktionstoxizität einer Substanz häufig nicht miteinbezogen. In dieser Studie wurden Effekte in einem Dosisbereich beobachtet, der nur 4,2- bzw. 28,6-fach höher liegt, als die höchsten und mittleren in menschlichem Brustfettgewebe gemessenen Konzentrationen an PBDE 99.

Effekte nach Exposition gegenüber niedrigen Dosierungen wurden bereits in verschiedenen experimentellen Studien nachgewiesen. Es wird derzeit kontrovers diskutiert, ob eine Risikoabschätzung ausschließlich auf der Basis von hohen Dosierungen möglich ist. Es existieren

zahlreiche wissenschaftliche Ergebnisse, die belegen, dass niedrige und hohe Dosierungen gegensätzliche Wirkungen hervorrufen können und Dosis-Wirkungsbeziehungen entsprechend unterschiedliche Verläufe nehmen können. Daher stellt sich die Frage, welche Konsequenzen für die Riskobewertung hieraus zu ziehen sind.

Es ist bekannt, dass die geltenden Richtlinien für reproduktionstoxikologische Studien Untersuchungen mit drei Dosierungen vorschreiben, von denen die höchste Dosis im Bereich der maternalen Toxizität liegen muss und die niedrigste Dosis der Feststellung eines NOAEL dient. Das Paradigma solcher Studien ist, die höchstmöglichen Dosierungen zu verwenden, ohne Berücksichtigung der bekannten oder erwarteten Humanexposition, die in der Regel um mehrere Größenordnungen unter den verwendeten Dosierungen liegt. Daraus resultiert, dass die Wirkungen von Umweltsubstanzen im Bereich der Humanbelastung (Niedrigdosisbereich) unerkannt bleiben. Aus diesem Grund sind Studien mit niedrigen Dosierungen und ihre Einbeziehung in die Risikobewertung für den Menschen notwendig.

Aus den oben genannten Gründen ist die Notwendigkeit eines Paradigmenwechsels in toxikologischen Studien ersichtlich. Meiner Ansicht nach ist es unerlässlich für eine Risikoabschätzung, Untersuchungen in einem Dosisbereich durchzuführen, der sich an der ca. 100-, 500- und 1000-fachen Humanbelastung orientieren sollte. Effekte, die nach Exposition mit höher liegenden Dosierungen beobachtet werden, sind für die Risikoabschätzung für den Menschen irrelevant.

Zurzeit können die Risiken, die von Substanzen im Niedrigdosisbereich ausgehen, nicht eingeschätzt werden!

Aktivitäten der VMGeco im OECD Test Guidelines Programme (Fische, Amphibien, Vögel, Wirbellose)

Stolzenberg, H.-C., Werschkun, B.

Umweltbundesamt, Ökotoxikologische Bewertung von Stoffen, 06844 Dessau

Der Vortrag bietet eine Übersicht über organisatorische Aspekte des OECD-Prüfrichtlinienprogramms, über den konzeptionellen Rahmen der spezifischen Aktivitäten mit Blick auf endokrine Wirkungen und über die konkreten Projekte der Validation Management Group for Screening and Testing of Endocrine Disrupters for Ecotoxicological Effects (VMGeco).

Organisatorischer Rahmen – das Test Guidelines Programme der OECD

Die Arbeiten der OECD zu den endokrin wirksamen Substanzen sind in das allgemeine Prüfrichtlinienprogramm der OECD eingebettet, das 1981 ins Leben gerufen wurde, um eine gegenseitige Anerkennung von Daten aus der Chemikalienprüfung durch die Mitgliedsstaaten zu erreichen (Mutual Acceptance of Data – MAD). Zu diesem Zweck widmen sich thematische Untergruppen sowohl der Überarbeitung bestehender als auch der Entwicklung und Validierung neuer Prüfrichtlinien, die abschließend in einem unabhängigen Peer Review beurteilt werden. Innerhalb dieses Rahmens wurde 1998 die Endocrine Disrupters Testing and Assessment Task Force (EDTA) gebildet, die alle Arbeiten zu endokrin wirksamen Substanzen betreut. Die konkreten Arbeiten finden in drei Validation Management Groups (VMG) statt: der VMGmammalian, gegründet im Februar 1999 für Methoden der klassischen Säugetiertoxizitätsprüfung, der VMGeco, gegründet im März 2001 für Methoden der Ökotoxizitätsprüfung, und der VMGnon-animal, gegründet im November 2002 für tierversuchsfreie Testmethoden.

Wie das OECD-Prüfrichtlinienprogramm insgesamt leiten sich auch die speziellen Aktivitäten zu endokrin wirksamen Substanzen von den Prioritäten und Präferenzen der einzelnen Mitgliedsländer ab und unterliegen dem Konsensprinzip. Den Antrieb bilden wissenschaftliche, technische oder politische Beiträge internationaler Workshops oder Meetings sowie von Gremien, wie etwa dem amerikanischen Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC), dem europäischen Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER) – vormals Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) – oder dem ehemaligen Scientific Committee on Plants (SCP) - mittlerweile Panel on Plant Health, Plant Protection Products and their Residues (PPR) - der European Food Safety Authority (EFSA).

Validierung

Die Validierung von Testmethoden innerhalb des OECD-Prüfrichtlinienprogramms basiert auf Kriterien und Prinzipien, die 1996 auf einem OECD-Workshop in Solna (Schweden) diskutiert wurden und in das Guidance Document (GD) 34 – „Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Test Methods for Hazard Assessment“ - eingeflossen sind. Darüber hinaus ist es wichtig, während eines Validierungsprozesses Flexibilität und

Transparenz zu wahren. Die experimentellen Validierungsarbeiten, an denen eine große Anzahl von Labors beteiligt sein kann, werden von den bereits erwähnten Validation Management Groups koordiniert.

Validieren bedeutet bestätigen, dass eine Methode zwei wesentliche Anforderungen erfüllt: Relevanz und Verlässlichkeit. Relevanz beschreibt die Beziehung zwischen einem Test und der Wirkung, die er untersuchen soll, und beantwortet die Frage nach dem Nutzen für einen bestimmten Zweck. Verlässlichkeit beinhaltet die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, wenn ein Test zu verschiedenen Zeiten und in verschiedenen Labors nach demselben Studienprotokoll durchgeführt wird. Vor dem Hintergrund dieser beiden Fragestellungen ist zu Beginn eines Validierungsprojekts festzulegen, welche Stoffe für die mit dem Test zu untersuchende biologische Wirkung als Referenzsubstanzen eingesetzt werden sollen.

An die wissenschaftliche und experimentelle Qualität von Validierungsarbeiten sind hohe Ansprüche zu stellen, die eine vergleichbare Expertise und technische Kompetenz erfordern wie erfolgreiche Forschungs- und Entwicklungsarbeiten. Dementsprechend benötigt Validierung erhebliche Ressourcen, bildet aber auch eine notwendige Voraussetzung für internationale Akzeptanz und den wirkungsvollen Einsatz von Testmethoden in regulatorischen Zusammenhängen.

Konzeptioneller Rahmen - die EDTA Toolbox

Auf ihrer sechsten Zusammenkunft 2002, einigte sich die EDTA Task Force darauf, die verfügbaren Methoden zur Prüfung potentiell endokrin wirksamer Substanzen nach einer Art Baukastensystem in fünf Gruppen abgestufter biologischer Komplexität und Aussagekraft einzuteilen und benannte dieses offene System als "Conceptual Framework". Wichtiger Bestandteil des Conceptual Framework sind sechs erläuternde Anmerkungen. (Zu Details s. Internet-Auftritt des OECD Prüfrichtlinienprogramms: <http://www.oecd.org/env/testguidelines> unter Endocrine Disrupters - Testing, Assessment oder direkt unter der URL http://www.oecd.org/document/58/0,2340,en_2649_34377_2348794_1_1_1_1,00.html).

Bei der vorgeschlagenen Toolbox handelt es sich nicht um ein vorgegebenes Testschema, sondern um eine Sammlung von Testmethoden, die nach dem jeweiligen Grad der mit ihnen erfassten biologischen Komplexität klassifiziert sind. Nicht alle Tests müssen mit jedem Stoff durchgeführt werden. Vielmehr ist, je nach verfügbarer Vorinformation, auf der Basis von Einzelfallentscheidungen zu ermitteln, auf welcher Stufe der EDTA-Toolbox mit speziellen Tests auf endokrine Mechanismen und Wirkungen begonnen werden soll und welche konkreten Tests die bestehenden Informationen sinnvoll komplementieren und einen Verdacht auf eine bestimmte endokrine Wirkung stichhaltig ausräumen oder verifizieren können. Nach dem derzeitigen Stand ist dieses Baukastensystem keinesfalls als abgeschlossen zu betrachten. Es enthält sowohl bestehende, gut etablierte Methoden als auch solche, die sich momentan noch in der Validierung befinden, und ist in der Zukunft um neue Methoden zu ergänzen, sobald solche entwickelt werden.

Validation Management Group for Ecotoxicity Testing

Wie schon zuvor erwähnt, obliegt die Koordination der konkreten experimentellen Validierungsarbeiten den drei der EDTA Task Force zugeordneten Validation Management Groups zur Säugetiertoxizität (VMGmammalian), zur Ökotoxizität (VMGeco) und zu alternativen, tierversuchsfreien Testmethoden (VMGnon-animal). Innerhalb der VMGeco sind noch einzelne Arbeits- und Expertengruppen zu unterscheiden, deren älteste, die Birds Expert Group, bereits 1994 gebildet wurde. Seit 2001 besteht die Fish Drafting Group, seit 2002 die Amphibians Expert Group und die Invertebrates Expert Group.

Vögel

Für Vögel wird unter der Federführung der USA ein Zwei-Generationentest zur Reproduktionsfähigkeit entwickelt. Bereits seit 1994 gab es in diesem Zusammenhang diverse Expertentreffen und experimentelle Beiträge zur Prävalidierung, und derzeit befinden sich 10-20 mögliche Endpunkte unter Review. Eine andere Variante, ein Ein-Generationentest, wird wegen Ressourcenmangels momentan nicht mehr weiterverfolgt.

Amphibien

Für Amphibien wird ein Assay zur Metamorphose von Fröschen entwickelt, der agonistische und antagonistische Wirkungen auf das Schilddrüsen-System erkennen lässt. Beobachtungsparameter sind das Entwicklungsstadium nach Nieuwkoop & Faber, die Hinterbeinlänge und die histologische Untersuchung der Schilddrüse. Der Test, der seit Ende 2000 im OECD-Arbeitsplan enthalten ist, befindet sich derzeit in der Validierungsphase 2, die federführend durch Japan, die USA und Deutschland vorangetrieben wird.

Wirbellose

Für wirbellose Tiere, bei denen insgesamt das Grundlagenwissen zu den endokrinen Systemen gering, die Interspeziesunterschiede aber möglicherweise zum Teil groß sind, befinden sich derzeit drei konkrete Verfahren in der Entwicklung: Ein Test zur Reproduktion und Entwicklung von Copepoden, unter der Federführung von Schweden und Dänemark, mit den Beobachtungsparametern Reproduktionserfolg und Geschlechterverhältnis, der sich mit harpacticoiden und calanoiden Testspezies seit 2004 in der Prävalidierungsphase befindet; ein Zwei-Generationentest an Mysiden, mit Prävalidierung und Federführung in den USA, zur Bestimmung von Reproduktion, Wachstum, Entwicklung und Sexualdifferenzierung; und ein erweiterter Reproduktionstest mit *Daphnia magna* – Prävalidierung und Federführung durch Japan –, der das Geschlechterverhältnis nach der Induktion geschlechtlicher Reproduktion und die Häutungshemmung bestimmt.

Fische

Zu Fischen sind derzeit mehrere Vorhaben in Arbeit: ein 21-Tage-Screening-Assay, ein Test zur Sexualentwicklung und ein Full-Life-Cycle- bzw. Zwei-Generationen-Test.

21d Fish Screening Assay

Der 21-Tage-Screening-Assay untersucht die Vitellogenin-Bildung, die sekundären Geschlechtsmerkmale und die Gonadenhistologie. Die Validierungsphase 1B wurde 2004 für die Spezies Amerikanische Elritze, Reifisch und Zebraabärbling abgeschlossen. Außerdem leisteten Großbritannien und Schweden Beiträge zur Untersuchung des Stichlings. Diskutiert wird noch darüber, welche Rolle die mit diesem Test gewonnenen histopathologischen Erkenntnisse und Fruchtbarkeitsdaten im Rahmen der Bewertung einnehmen sollen - werden hier rein endokrine Effekte erfasst oder auch anders geartete Reproduktionstoxizität? Das Testprotokoll müsste auch noch modifiziert werden, wenn die Detektion anti-androgener Wirkungen möglich sein soll. Als nächste Schritte sind quantitative Daten zur Fruchtbarkeit zu sammeln, negative Kontrollsubstanzen zu testen und die OECD-Monographie zur Gonaden-Histologie der drei Testfischarten fertig zu stellen.

Fish Sexual Development Test

Der Test zur Sexualentwicklung von Fischen geht auf einen Vorschlag der nordischen Länder, unter der Federführung Dänemarks, zurück und beinhaltet eine Erweiterung der bestehenden TG 210 zur Toxizität im frühen Lebensstadium. Mit der Berücksichtigung von Embryos, Larven und juvenilen Fischen einschließlich der geschlechtslabilen Periode sollen dabei alle Lebensabschnitte abgedeckt werden, die gegenüber Einflüssen auf das endokrine System besonders empfindlich sind. Beobachtet werden, über einen Zeitraum von insgesamt 40-60 Tagen, Schlupferfolg, Wachstum und Entwicklung, Geschlechterdifferenzierung, Gonadenhistologie und Vitellogenin-Produktion. Gegenwärtig findet eine intensive Abstimmung des Testprotokolls statt mit dem Ziel eines Validierungsvorschlags für Amerikanische Elritze, Japanischen Reifisch und Zebraabärbling. Im Rahmen einer Bewertungsstrategie stellt sich im Zusammenhang mit diesem Untersuchungsansatz noch die spannende Frage, auf welcher Stufe zwischen Screening und definitivem Test die Aussagekraft dieses Tests anzusiedeln ist.

Fish Full Life-Cycle/Two-Generation Test

Der Full-Life-Cycle- bzw. Zwei-Generationen-Test in Fischen betrachtet die Fruchtbarkeit, den Schlupferfolg, Wachstum und Entwicklung, Geschlechterdifferenzierung, Gonadenhistologie, Vitellogenin-Bildung und gegebenenfalls weitere Parameter in der Elterngeneration (P) und zwei Generationen von Nachkommen (F1, F2). Beiträge zur Prävalidierung bzw. Validierung sind in Japan, den USA und Deutschland derzeit in Arbeit. Dieser Test wirft als „definitiver Test“ auf endokrine Wirksamkeit insbesondere folgende Fragen auf: Welche Endpunkte müssen abgedeckt werden? Welche können abgedeckt werden? Aufgrund welcher Vorinformationen ist im Rahmen einer (regulatorischen) Stoffbewertung die Durchführung eines solchen umfassenden Tests zu fordern?

Die Quadratur des Kreises?

Damit Testmethoden internationale Gültigkeit und Anerkennung erfahren, müssen sie sich einem Spannungsfeld von Anforderungen stellen, die auf den ersten Blick zuweilen schwer miteinander vereinbar erscheinen:

Einzelne Tests sollen in einen flexiblen, nicht bindenden konzeptionellen Rahmen eingepasst sein, gleichzeitig aber in einer einzigen validierten, in allen OECD-Ländern anerkannten Prüfrichtlinie festgeschrieben werden, die dabei nach Möglichkeit noch Raum für

eine Beibehaltung unterschiedlicher regionaler Präferenzen für bestimmte Testspezies bietet.

Methodeninnovation und Entwicklung neuer Endpunkte sind zur Bewältigung der anstehenden Bewertungsaufgaben dringend gefragt, können aber bei zunehmender Komplexität der Methoden auch die Konsensfindung umso schwieriger werden lassen.

Und ist es einerseits insgesamt erstrebenswert, dass zur Stoffbewertung so viele „Werkzeuge“ wie nötig zur Verfügung stehen, sollen andererseits die Bewertungsverfahren und Stoffpolitiken harmonisiert werden, was bei einer zunehmenden Anzahl möglicher Testverfahren auch immer komplexer werdender Abstimmungsprozesse bedarf.

Zum Abschluss

Von 67 Projekten im Arbeitsplan des OECD-Prüfrichtlinienprogramms haben 19 einen Bezug zu endokrinen Wirkungen, von denen wiederum 9 im Bereich der VMGeco angesiedelt sind. Aber noch hat keines dieser Projekte zur Verabschiedung einer Prüfrichtlinie mit Bezug zum endokrinen System geführt.

Die Etablierung einer regulatorisch relevanten Prüfrichtlinie ist ohne Validierung nicht möglich. Und Validierung kostet Ressourcen.

Eine arbeitsteilige Organisation, wie sie das OECD-Prüfrichtlinienprogramm vorsieht, erfordert gezielte und substanzielle Beiträge auf allen Ebenen: von den Expertengruppen über die Validation Management Groups bis hin zur EDTA Task Force und der Arbeitsgruppe der nationalen Koordinatoren des Prüfrichtlinienprogramms (WNT).

Das Konsensprinzip benötigt gute Kommunikation sowohl innerhalb einzelner Ebenen als auch zwischen ihnen – und ab und zu auch einen Kompromiss.

Regulatorisches Handeln ist nicht möglich ohne relevante Testergebnisse, für die geeignete Methoden bereit stehen müssen. Gleichzeitig erfordert die Entwicklung und Ausgestaltung relevanter Testmethoden die präzise Formulierung des regulatorischen Bedarfs.

In vitro-Tests zur Prüfung potenziell endokriner Wirkungen von chemischen Verbindungen: Die Arbeit der „Validation Management Group – Non-animal Assays“ bei der OECD

Seibert, H.

Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Brunswiker Str. 10, 24105 Kiel

Hintergrund für die Einrichtung der „Validation Management Group - Non-animal Assays“ (VMG-NA) im Jahr 2003 war die Einschätzung der „Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA)“, dass eine dringende Notwendigkeit bestehe, relativ kostengünstige und schnelle *In vitro*-Tests zur Prüfung endokriner Wirkungen von Chemikalien zu entwickeln. Das „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ fordert Methoden, die in Stufe 1 („Sorting and prioritization“) und Stufe 2 („*In vitro* assays providing mechanistic data“) angewendet werden können. Dementsprechend ist es erklärtes Ziel der Arbeit der VMG-NA, (i) im Hinblick auf die Aufnahme als „OECD Test Guidelines“ oder „Guidance Documents“ Tests und Übersichtsberichte zu identifizieren und vorzuschlagen und (ii) Aktivitäten zu koordinieren, die zur experimentellen Prävalidierung bzw. Validierung viel versprechender Tests/Assays führen.

Zurzeit existiert noch kein validierter *In vitro*-Assay oder QSAR-Ansatz, der im Rahmen der Prüfung auf potenziell endokrine Wirkungen von Chemikalien eingesetzt werden könnte. International laufen allerdings schon seit mehreren Jahren Vorhaben, die die Entwicklung und Validierung derartiger Methoden zum Ziel haben. Die in der VMG-NA diskutierten tierversuchsfreien Testmethoden lassen sich folgenden Gruppen zuordnen: Rezeptorbindungsassays, Reporter- und Transaktivierungsassays, Steroidsynthese- und Aromataseassays, QSARs und andere „*In silico*-Methoden“ sowie *In vitro* Zell- bzw. Gewebeassays.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über den Stand der Arbeiten zu Rezeptorbindungsassays. Relativ weit fortgeschritten, gemessen an der Zahl der geprüften Substanzen, sind Bindungsassays mit rekombinanten humanen Östrogen- und Androgenrezeptoren (ER α , AR). Demgegenüber befinden sich Tests zur Bindung an humane Thyroxinrezeptoren (TR) erst in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung. Insbesondere in Japan, wo die von CERI (Chemicals Evaluation and Research Institute) bzw. METI (Ministry of Economy, Trade and Industry) entwickelten Assays als „established“ angesehen werden, ist bereits eine große Zahl von chemischen Substanzen auf ihre Affinität zu Östrogen- bzw. Androgenrezeptoren geprüft worden. In einem gemeinsamen Projekt arbeiten ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods, Ispra), EPA (Environmental Protection Agency, USA) und CERI an der Optimierung bzw. Prävalidierung kommerziell erhältlicher Assays zur Bindung an ER α bzw. AR. Die EPA hat sich zusätzlich mit der Validierung von Tests beschäftigt, in denen die Bindung an native Rezeptoren aus dem Uterus bzw. der Prostata von Ratten geprüft wird. Der Abschlussbericht soll im Jahr 2006 vorgelegt werden.

Tabelle 1: Rezeptorbindungsassays

Rezeptor	Herkunft	Status	Organisation
Human ER α	rekombinant (kommerziell)	„established“, 1200 Substanzen geprüft	CERI/METI (Japan)
Human AR	rekombinant (kommerziell)	„established“, 500 Substanzen geprüft	CERI/METI (Japan)
Human TR	rekombinant	in Entwicklung	CERI/METI (Japan)
Human ER α	rekombinant (kommerziell, PanVera)	Optimierung, Prävalidierung	ECVAM/EPA/CERI
Ratte AR	rekombinant (kommerziell, PanVera)	Optimierung, Prävalidierung	ECVAM/EPA/CERI
Ratte ER α	Uterus-Zytosol	Validierung (Abschlussbericht 2006)	EPA (USA)
Ratte AR	Prostata-Zytosol	Validierung (Abschlussbericht 2006)	EPA (USA)

Unter den zahlreichen Reporter-Gen/Transaktivierungsassays (s. Tabelle 2) liegen die meisten Ergebnisse für Testmethoden mit stabil transfizierten Klonen von HeLa-Zellen (human ER α) und CHO-Zellen (human AR) vor. Gerade erst begonnen wurden Arbeiten an Systemen, die den humanen Thyroxinrezeptor exprimieren.

Tabelle 2: Reporter-Gen-/Transaktivierungsassays

Assaysystem	Rezeptor	Status	Organisation
HeLa-Zellen Klon: hER-HeLa-9903	human ER α	„established“, > 1200 Substanzen, Inter- laborvergleich durchgeführt	CERI/METI (Japan)
CHO-Zellen Klon: AREcoScreen TM	human AR	„established“, > 500 Substanzen, Interla- borvergleich durchgeführt	CERI/METI (Japan)
	human TR	in Entwicklung	CERI/METI (Japan)
Transiente Expressions- systeme (Zelllinien)	humanER α	?	CERI/METI (Japan)
	human ER β	?	
	human AR	?	
	Ratte ER α	?	
MDA-kb2 Zelllinie	human AR	17 Substanzen, „Testentwicklung“	EPA
BG-1 Zelllinie Klon: LUMI-Cell TM	human ER α	110 Substanzen, soll „standardisiert und validiert“ werden	ICCVAM*

*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, USA

Assays zur Prüfung der Wirkung von chemischen Verbindungen auf die Aktivität der Aromatase sowie auf die Steroidsynthese befinden sich in einem frühen Entwicklungsstadium.

Insbesondere CERI (Japan) arbeitet an der Entwicklung von 3D-QSAR-Modellen zur Prädiktion der Bindung von Substanzen an ER α . Die Ergebnisse mit einem Trainingssatz von 258 Chemikalien lassen bisher allerdings noch keine ausreichende Qualität der Modelle erkennen (Spezifität ~ 18%). Zur Fortführung der Entwicklung von QSARs und anderen „In silico-Methoden“ wird innerhalb der VMG-NA eine „QSAR-Task Group“ eingerichtet.

Im Auftrag der VMG-NA sind vier „Detailed Review Papers“ erarbeitet worden, die die folgenden Gebiete behandeln: „Steroidogenesis assessment“, „Aromatase assessment“, „Metabolism assessment“, „Thyroid Hormone Disruption Assays“.

In der nächsten Zukunft sind folgende Arbeiten geplant:

- CERI (Japan) will die etablierten ER α - und AR-Bindungsassays optimieren (mehr Chemikalien testen) und die Ergebnisse mit denen des uterotrophen bzw. Hersberger-Assays vergleichen.
- Die EPA (USA) will die Protokolle für die Assays mit Cytosol aus dem Rattenuterus (ER-Bindung) bzw. aus der Rattenprostata (AR-Bindung) standardisieren und optimieren.
- Die EPA (USA) will einen Assay mit H295R-Zellen experimentell validieren, mit dem Wirkungen auf die Steroidsynthese geprüft werden sollen.
- CERI will einen Assay mit KGN-Zellen experimentell validieren, mit dem Wirkungen auf die Aktivität der Aromatase geprüft werden sollen.

Obwohl insbesondere in Japan und den USA erhebliche Anstrengungen unternommen werden, ist zurzeit nicht absehbar, wann das Validierungsverfahren für die erste *In vitro*-Testmethode zur Prüfung von Chemikalien auf potentiell endokrine Wirkungen abgeschlossen und eine „Test-Guideline“ verfasst sein wird.

Aktivitäten der „Validation Management Group – Mammalian Assays“ im OECD Test Guidelines Programme

Lichtensteiger, W.

Universität Zürich, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

Im „Conceptual Framework“ der OECD sind für *in vivo*-Tests drei verschiedene Komplexitätsebenen vorgesehen, zur Identifikation endokrin aktiver Stoffe (EDC) „Level 3“ (single mechanisms) und „Level 4“ (multiple mechanisms), „Level 5“ für Tests zur Risikobeurteilung. Zu Beginn der Beratungen in EDTA und VMG-Mammalian wurde beschlossen, Level 5 vorerst nicht zu bearbeiten, sondern die existierenden OECD-Richtlinien TG416 (Two Generation) und TG415 (One Generation) zu verwenden. Später wurden TG421 und TG422 zu Level 5 hinzugefügt, die allerdings keine vollwertigen Grundlagen liefern. Das Schwergewicht wird auf TG416 gelegt. Für die *in vivo*-Identifikation wurden zwei vorbestehende Tests, Uterotropher Assay und Hershberger Assay (Level 3), sowie eine Modifikation der Richtlinie TG407 (enhanced, Level 4) evaluiert.

Die Arbeiten zum **Uterotrophen Test** sind am weitesten fortgeschritten. Dieser Hochdosis-Test wird seit langem zur Identifikation estrogener Aktivität eingesetzt, Endpunkt ist das Uterusgewicht. Die VMG-Mammalian untersuchte verschiedene Varianten, präpubertäre Ratte (immature rat) mit dreimaliger oraler (Gavage) oder subkutaner Substanzapplikation (Protokolle A und B) sowie ovariektomierte adulte Ratte mit 3 oder 7 subkutanen Injektionen (Protokolle C und D). In **Phase 1** der Validierung (19 Labors) wurde die Reproduzierbarkeit der Dosis-Wirkungskurve für Ethinylestradiol etabliert. In **Phase 2** (20 Labors) wurden Ethinylestradiol, Bisphenol A, o,p'-DDT, Genistein, Methoxychlor, Nonylphenol untersucht, zunächst Dosis-Wirkungsbeziehungen. Anschließend wurden Experimente mit den gleichen Substanzen in kodierter Form durchgeführt. Die Validierung bestätigte grundsätzlich die Eignung des Testprotokolls, zeigte aber auch Probleme bei der Durchführung auf. Eine Peer Review beurteilte die Ergebnisse der Validierungsstudie kontrovers. An der EDTA8 vom Januar 2005 wurde indessen beschlossen, keine weiteren Validierungsstudien anzuschließen, sondern eine Richtlinie auszuarbeiten, allerdings unter Berücksichtigung einiger kritischer Punkte in der Versuchsanordnung.

Der **Hershberger Test** dient zur Identifikation (anti)-androgener Aktivität, er wird an jungadulten kastrierten männlichen Ratten durchgeführt. Androgene verhindern die kastriationsbedingte Abnahme des Gewichts männlicher Reproduktionsorgane, Anti-Androgene antagonisieren diesen Effekt. Auch hier wird vom höheren Dosisbereich ausgegangen. In **Phase 1** (18 Labors) wurden Dosis-Wirkungskurven von Testosteron-propionat (TP) und Flutamid etabliert. **Phase 2** (16 Labors) untersuchte Dosis-Wirkungsbeziehungen von Agonisten (TP, 17 α -Methyltestosteron, Trenbolone) und Antagonisten (Vinclozolin, Procyridone, Linuron, p,p'-DDE, Flutamid) sowie des 5 α -Reduktasehemmers Finasterid. In **Phase 3** kommen kodierte Substanzen zum Einsatz, auch soll eine neue Testvariante an der „juvenilen“ (präpubertären) männlichen Ratte (analog zu „immature female“) evaluiert werden. Die Berichte sind pendent, auch diese Ergebnisse sollen einer Peer Review vorgelegt werden.

Der Versuch mit einer Modifikation der Richtlinie TG407 (28 Tage oral), **TG407 enhanced**, geht davon aus, dass dieser Test häufig durchgeführt werden muss, weshalb nützlich wäre, wenn mit ihm auch noch endokrine Effekte erfasst werden könnten. Aus einer Anzahl von Endpunkten wurden nach **Phase 1** Reproduktionsorgane (Gewicht, Histopathologie), Spermien (Zahl, Morphologie) und Schilddrüsenhormon-Spiegel als zusätzliche Endpunkte ausgewählt. In **Phase 2** (20 Labs) wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen von Ethinylestradiol, Tamoxifen, Methyltestosteron, Flutamid, L-Thyroxin, Propylthiouracil („stark wirksame Stoffe“) und Genistein, Nonylphenol, CGS 18320B1 (Aromatase-Hemmer), p,p'-DDE („schwach wirksame“) untersucht. Aus den bisherigen Diskussionen gewinnt man den Eindruck, dass der Test vor allem Effekte auf die Schilddrüsenachse erfassen kann; bezüglich schwach wirksamer Stoffe scheint er weniger sensitiv. Der Schlussbericht steht aber auch hier noch aus.

Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System - Von der Testung zur Bewertung in der Toxikologie

Stropp, G.

Bayer HealthCare AG, Toxikologie, 42096 Wuppertal

Abstract

Testmethode: Während in vitro Testmodelle für mechanistische Untersuchungen und das Screening einer großen Zahl an Stoffen geeignet sind, kommt den in vivo Testmodellen ein besonderer Stellenwert im Rahmen der Risikobewertung zu. Valide Testmethoden, wie sie derzeit von der OECD entwickelt werden, sind hierfür essentiell. Als Studientyp, der zahlreiche Mechanismen der Toxizität berücksichtigt, ist die erweiterte subakute Studie von besondere Bedeutung.

Teststrategie: Die OECD hat einen Rahmen zur Testung und Bewertung endokrin aktiver Stoffe entwickelt. Er umfasst ein 5-stufiges Prüf- und Bewertungskonzept, in dem ausgehend von der vorliegenden Datenlage und theoretischen Betrachtungen über verschiedene Stufen der in vitro und in vivo Testung die Wirkung der Substanzen untersucht werden kann. Die Teststrategie hängt von der jeweiligen Fragestellung ab. Als Entscheidungshilfe hierfür hat der VCI einen Vorschlag entwickelt.

Bewertung: Die endokrine Aktivität ist kein separater Endpunkt, sondern einer von vielen Mechanismen der Toxizität. Zur Bewertung einer Substanz können daher die üblichen Methoden der Risikobewertung sowie das bestehende Einstufungssystem angewandt werden. Die Bewertung muss auf der Grundlage aller verfügbarer Daten erfolgen, wobei im „Weight of Evidence Approach“ Plausibilität, Relevanz und Reproduzierbarkeit von Befunden ebenso zu berücksichtigen sind wie Informationen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie die Charakterisierung der Schadwirkung mit der niedrigsten Schwelle.

Einleitung

Es wird ein Überblick gegeben zur derzeitigen Entwicklung und zum Stellenwert diverser Testmethoden, zur Teststrategie und zur Bewertung von endokrin aktiven Stoffen im Rahmen einer Risikobewertung sowie bei der Einstufung und Kennzeichnung von Substanzen.

Zur Definition: Ein endokrin aktiver Stoff hat eine hormonartige oder hormonähnliche Wirkung. Diese Definition erlaubt keine Aussage zur Stärke der Wirkung und darüber, ob es zu nachteiligen Folgen durch die hormonähnliche Wirkung kommt. Endokrine Wirksamkeit ist nicht automatisch mit einem „adversen Effekt“ gleichzusetzen (Bolt & Degen 2000). In einem durch die DG XII der Europäischen Kommission, unter Beteiligung von OECD, WHO und BMU ausgerichteten Workshop im Dezember 1996 in Weybridge, wurde folgende Definition vereinbart: „An endocrine disrupter is an exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, secondary (consequent) to changes in endocrine function. A potential endocrine disrupter is a substance

that possesses properties that might be expected to lead to endocrine disruption in an intact organism“ (EU 1996). Diese sogenannte „Weybridge“-Definition ist eindeutig fokussiert auf adverse Effekte, die im intakten Organismus beobachtet werden, wobei die hormonelle Störung als toxischer Mechanismus für diese schädigenden Wirkungen angesehen wird. In Übereinstimmung mit der Weybride-Definition wurde die Definition eines Endocrine Disruptors von der WHO 2002 festgelegt als: “An endocrine disrupter is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub) populations“ (WHO IPCS 2002).

Testmethoden – Entwicklung und Stellenwert

Eine Vielzahl von Testmethoden zur Toxizitätsprüfung in vitro oder in vivo stehen bereits heute zur Verfügung. Weitere Methoden werden derzeit entwickelt.

(OECD 2005). In vitro Testmethoden sind besonders für mechanistische Untersuchungen sowie für vergleichende Untersuchungen einer großen Zahl von Stoffen bezüglich einer spezifischen Fragestellung (Screening) geeignet. Einschränkungen für die Anwendbarkeit liegen in der großen Vielfalt der möglichen Mechanismen die zu einer Schädigung führen können und in der Tatsache dass Metabolismus und Kinetik nur sehr eingeschränkt oder gar nicht erfasst sind (Greim 2004). Daraus resultiert eine Unsicherheit bei der Extrapolation auf die in vivo Situation, insbesondere bezüglich der Dosis-Wirkungs-Beziehung und der Erkennung des für die Risikobewertung relevantesten Parameters. In vivo Testmethoden sind ebenfalls für mechanistische Untersuchungen und für Screening-Untersuchungen geeignet. Zusätzlich liefern in vivo Studien Daten zu Zielorganen einer toxischen Wirkung sowie zur Dosis-Wirkungsbeziehung und sind daher für die Risikobewertung von besonderer Bedeutung. Diesem Nutzen sind Tierschutzaspekte sowie die gegenüber in vitro aufgrund von höherem Aufwand geringere Verfügbarkeit gegenüberzustellen. Als Schlussfolgerung aus diesen Erwägungen ist abzuleiten, dass der Erkenntnisgewinn aus in vivo Studien durch die Verwendung von validierten Testmethoden optimiert sein sollte.

Die Validierungsaktivitäten der OECD zur in vivo Testung endokrin aktiver Stoffe umfassen den Uterotrophie-Test, den Hershberger Assay sowie die Erweiterung der Studie zur subakuten Toxizität (OECD Testmethode 407) (Gelbke et al. 2004). Die beiden erstgenannten Methoden erfassen einzelne Parameter bzw. ein definiertes Hormonsystem (Uterotrophie-Test für Östrogenität und Anti-Östrogenität; Hershberger Assay für Androgenität und Antiandrogenität) und sind daher z.B. für das Screening geeignet, während die Erweiterung der Studie zur subakuten Toxizität zahlreiche Parameter und viele Wirkmechanismen umfasst. Die Erweiterung der Studie zur subakuten Toxizität ist von besonderer Relevanz, da die heute angewandte Testmethode bereits anerkannter Bestandteil der internationalen Chemikalienbewertung ist. Die Validierung der Erweiterung ist bei der OECD bereits weit fortgeschritten und hat gezeigt, dass die Folgen einer adversen hormonartigen Wirkung (Östrogenität, Androgenität, Schilddrüse) erfasst werden (Hofmann 2004, Gelbke et al 2004). Darüber hinaus wird wie in der bereits heute angewandten Methode auch die allgemeine Giftigkeit aufgrund hormonartiger Wirkung und anderer Wirkmechanismen umfassend erfasst, und es ist möglich, die Relation von systemischer Toxizität und hormonartiger Wirkung direkt zu untersuchen. Die erweiterte Studie zur subakuten Toxizität wird daher zukünftig einen hohen Stellenwert für die Teststrategie haben.

Teststrategie

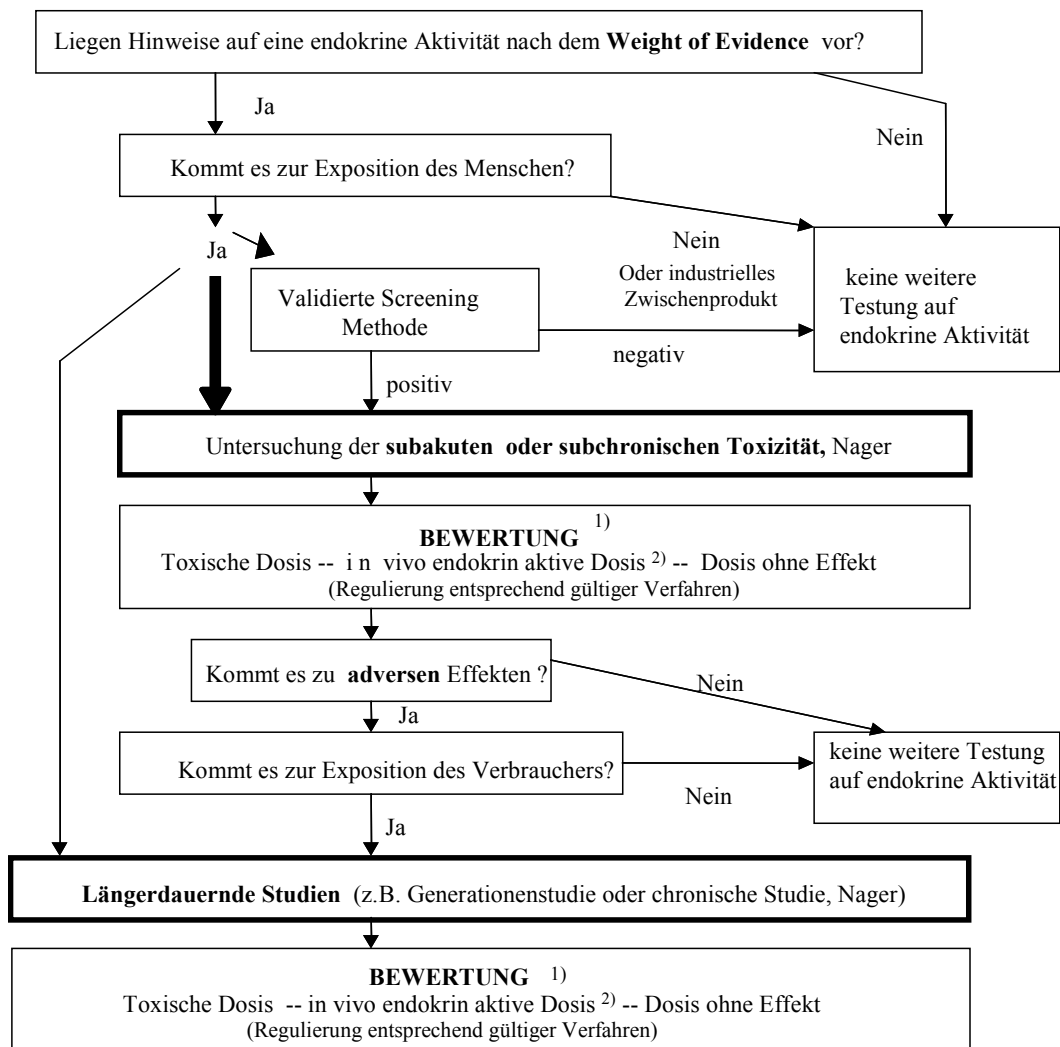
Die OECD hat einen Rahmen zur Testung und Bewertung endokrin aktiver Stoffe entwickelt (vgl. Abbildung 1). Er umfasst ein 5-stufiges Prüf- und Bewertungskonzept, in dem ausgehend von der vorliegenden Datenlage und theoretischen Betrachtungen über verschiedene Stufen der *in vitro* und *in vivo* Testung die Wirkung der Substanzen untersucht werden kann (OECD 2005; Gelbke et al. 2004). Das Konzept beinhaltet die Untersuchung verschiedener Mechanismen ebenso wie Testsysteme zur Untersuchung verschiedener Zielorgane. Die Teststrategie hängt von der jeweiligen Fragestellung ab. In Stufe 2 sind die *in vitro* und in Stufe 3 die *in vivo* Testmethoden zur Untersuchung einzelnen Parameter oder Hormonsysteme gruppiert, während in Stufe 4 und 5 die Testmethoden zur Untersuchung mehrerer Parameter, Wirkmechanismen und Effekte zusammengefasst sind. Die Methoden der Stufe 4 und 5 sind für die Beurteilung der Gefährdung und für die Risikobewertung geeignet. Testmodelle, die mehrere Parameter erfassen, ersetzen selektive Testmethoden zu einzelnen Parametern („multimodal model“ versus „single endpoint assay“). Ein- und Ausstieg in das Prüfkonzept soll auf allen Ebenen möglich sein. Die Bewertung einzelner Stoffe soll „case by case“ auf der Basis aller verfügbarer Daten nach dem so genannten Weight of Evidence Approach erfolgen (Harvey & Johnson 2002).



Abbildung 1. OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals (based on the 6th meeting of the OECD Task Force; www.oecd.org)

Die konkrete Teststrategie für einen Verdachtstoff hängt von der jeweiligen Fragestellung ab. Als Entscheidungshilfe für die Testung und Bewertung von endokrinen Verdachtstoffen hat der Verband der Chemischen Industrie VCI einen Vorschlag entwickelt (vgl. Abbildung 2; Klotz 2003). Die entscheidende Frage, inwieweit durch eine endokrin aktive Substanz eine tatsächliche Gefährdung des Menschen zu erwarten ist, lässt sich nur durch

entsprechend umfassende Tierversuche (z.B. subakute/subchronische Toxizitätsprüfungen; Generationsstudien oder chronische Toxizitätsstudien) und eine darauf aufbauende Risikobewertung unter Berücksichtigung verfügbarer Expositionsdaten beantworten. Der erste Schritt der Bewertung ist die Erfassung der verfügbaren Informationen. Ergibt sich daraus Hinweise auf eine endokrine Aktivität eines Stoffes, ist im nächsten Schritt zu klären, inwieweit es zu einer Exposition des Menschen kommen kann, die eine Abklärung dieses Hinweises notwendig macht. Für die Abklärung des Verdachtes auf eine endokrine Aktivität können validierte Screening-Methoden Hinweise liefern. Relevanter für die Bewertung sind aber Testmethoden, die mehrere Parameter und die Dosis-Wirkungs-Beziehung erfassen (z.B. Studien zur subakuten oder subchronischen Toxizität) und die eine Aussage zur Frage der Dosis ohne schädliche Wirkung (NOAEL) aufgrund einer endokrinen Aktivität im Vergleich mit einer entsprechenden Dosis für die allgemeine Toxizität möglich machen. Ergibt sich Hinweise auf eine schädliche (adverse) Wirkung, ist über weiterführende Studien, abhängig von einer möglichen Exposition, zu entscheiden.



¹⁾ Adverser Effekt? Vergleich NOAEL endokrin mit NOAEL für die allgemeine Toxizität.

²⁾ Bei relevantem Aufnahmeweg und adversen Effekten

Abbildung 2. Entscheidungsbaum für die Testung und Bewertung von endokrinen Verdachtsstoffen (nach Klotz 2003).

Bewertung

Die endokrine Aktivität ist kein separater Endpunkt, sondern einer von vielen Mechanismen der Toxizität (IPCS 2002, CSTE 2000, Harvey & Johnson 2002). Es können daher auch für endokrin aktive Stoffe die üblichen Methoden der Risikobewertung angewandt werden (CSTE 2000). Dies wurde kürzlich auch im Rahmen des Statusberichtes zur EU Gemeinschaftsstrategie (Council of the European Union 2004) bestätigt.

Bei der Charakterisierung der Gefährdung sind folgende Aspekte zu betrachten:

- 1) Der Bewertung sollen biologisch relevante Parameter und Endpunkte zugrunde liegen.
- 2) Diese sollen in validen, robusten und standardisierten Testmethoden untersucht worden sein.
- 3) Die komplette verfügbare Datenlage ist zu sichten und zu bewerten und
- 4) die Plausibilität der verfügbaren Daten und Informationen muss überprüft werden.
- 5) Die Adversität von beobachteten Effekten muss geklärt sein und
- 6) die Dosis-Wirkungs-Beziehung muss bekannt sein. Bleiben bei der Bewertung der Daten unter diesen Gesichtspunkten Fragen offen oder liegen inplausible Ergebnisse vor, ist ggf. die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen zu überprüfen.

Bei der endokrinen Aktivität handelt es sich um spezifische Wirkmechanismen, die insbesondere bei Langzeit-Expositionen zu gesundheitlichen Schäden führen können, aber nicht müssen. Diese Schädigungen werden grundsätzlich durch die bestehende toxikologische Prüfstrategie erfasst. Mögliche adverse Effekte endokriner aktiver Stoffe betreffen das Fortpflanzungssystem sowohl hinsichtlich der Fortpflanzungsfähigkeit (Fertilität) als auch der Entwicklung der Nachkommenschaft (fruchtschädigend), die Bildung von Krebs sowie funktionelle und morphologische Veränderungen. Diese möglichen Schädigungen werden durch das bestehende Einstufungssystem des europäischen Chemikalienrechts bereits heute erfasst (CSTE 2000), z.B. über die Einstufung zur Reproduktionstoxizität, zur Toxizität wie akuter oder wiederholter Exposition und die Einstufung zur Kanzerogenität, so dass ein eigenständiges Gefahrenmerkmal weder sinnvoll noch notwendig ist.

Zusammenfassung

Valide in vivo Testmethoden sind für die toxikologische Bewertung von Stoffen von entscheidender Bedeutung. Die Teststrategie hängt entscheidend von der jeweiligen Fragestellung ab und die Bewertung erfolgt im Rahmen von Risikobewertung und Einstufung. Dies gilt auch für endokrin aktive Stoffe.

Literatur

Bolt H & Degen G: Hormoneffekte von Chemikalien in Nahrung und Umwelt. Chemie in unserer Zeit 34, 30-37, 2000

Council of the European Union: Commission Staff Working Document on implementation of the Community Strategy for Endocrine Disruption – a range of substances suspected of interfering with the hormone systems in humans and wildlife (COM(1999) 706); EU 14341/04, 2004

- CSTEE: Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment: Opinion on BKH Consulting Engineers Report "Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption" – Opinion adopted at the 17th CSTEE plenary meeting, Brussels, 5 September, 2000. http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/sct/docshtml/sct_out73_en.htm
- EU: European Commission; Environment and Climate Research Programme of DG XII: European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife. Report of Proceedings, Weybridge, UK, 2.-4. December 1996
- Gelbke HP, Kayser M, Poole A: OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 205, 17-25, 2004
- Greim H: The endocrine and reproductive system: adverse effects of hormonally active substances? *Pediatrics* 113, 1070-1075, 2004
- Harvey PW & Johnson I: Approaches to the assessment of toxicity data with endocrine disruption. *J. Appl. Toxicol.* 22, 241-247, 2002
- Hofmann A: The "enhanced" subacute toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active chemicals. Comparison with toxicity tests of longer duration. www.cefic-iri.org/files/events
- Klotz G: Endokrine Effekte. Bewertung aus industrieller Sicht, in Track & Kreysa (Hrsg.) *Spurenstoffe in Gewässern*, Wiley-VCH 2003
- OECD 2005: www.oecd.org
- WHO IPCS: International Programme on Chemical Safety: Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruption. IPCS 2002

Testen und Bewerten - eine Teststrategie für Fische

Schäfers, C., Teigeler, M.

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME), Auf dem Aberg 1,
57392 Schmallenberg

Einleitung

Endokrine Disruptoren: Rolle der Fische

Endokrin wirksame Chemikalien (Endocrine disrupting chemicals EDCs) stellen Liganden für endogene Hormonrezeptoren oder aktive Zentren von Enzymen dar. Sie sind wirksam im wässrigen Zellmilieu und zeichnen sich deshalb durch eine gewisse Wasserlöslichkeit und zumeist deutliche Lipophilie aus.

Im Gegensatz zur Gefährdung der menschlichen Gesundheit steht für Wasserorganismen die Exposition über das Umgebungswasser und damit die Belastung des Atemmediums im Mittelpunkt. Dieser Expositionspfad hat besondere Bedeutung bei leistungsfähigen Organismen mit einem hohen Stoffaustausch an den Kiemen. Deshalb gehören Fische zu den am stärksten potenziell belasteten Wasserorganismen.

Fische weisen zudem bezüglich des evolutionär konservativen Steroidhormonsystems große Ähnlichkeiten mit Säugetieren auf. So kann säugertoxikologisches Wissen zur Abschätzung der Gefährdung aquatischer Systeme herangezogen werden. Gleichzeitig kann das System Fisch zur ersten Abschätzung des Wirkpotenzials fraglicher Substanzen bei Säugern genutzt werden.

Direkte Wirkmechanismen sexual-endokriner Wirkung

Als EDCs werden hier nur Substanzen betrachtet, denen spezifische Beeinträchtigungen hormonal vermittelter Lebensleistungen nachgewiesen werden können. Dies betrifft vor allem die Entwicklung und Fortpflanzung. Eine stark vereinfachende Klassifizierung direkter sexual-endokriner Wirkungen in Fischen teilt diese in Rezeptor-Interaktionen und Synthesehemmungen ein. Im ersten Fall werden der Östrogen- und/oder der Androgenrezeptor gehemmt oder stimuliert, im letzten Fall wird über eine Enzymhemmung die Synthese von Testosteron (allgemeine Sexualsteroid-Synthesehemmung), 11-Ketotestosteron (11-Hydroxylase-Hemmung) oder/und 17-beta-Östradiol (Aromatase-Hemmung) beeinträchtigt. Dabei kann das Erscheinungsbild einer östrogenen, androgenen, anti-östrogenen oder anti-androgenen Wirkung sowie verschiedener Mischformen entstehen.

Endpunkte: Schutzziel und Wirkindikatoren

Populationsrelevante Endpunkte

Im Gegensatz zum humantoxikologischen Schutzziel der individuellen Gesundheit ist das primäre Schutzziel ökotoxikologischer Betrachtungen die Population. Von besonderer Bedeutung sind deshalb Wirkungen, die die Populationsentwicklung beeinträchtigen. Die betroffenen Kenngrößen von Populationen sind stadienspezifische Überlebensraten und die intrinsische Reproduktionsrate. Letztere wird beeinflusst durch die Generationsdauer (Zeitraum bis zur ersten Reproduktion), die Anzahl produzierter Nachkommen pro Weib-

chen und das Geschlechterverhältnis. Diese Endpunkte sind für das Hazard- und Risk-Assessment von zentraler Bedeutung. In Experimenten ermittelte Beeinträchtigungen könnten mittels Simulationsmodellen auf ihre Bedeutung für Populationen hochgerechnet werden. Allerdings existieren bis heute keine standardisierten Testverfahren für Fische, die jenseits der stadienspezifischen Überlebensraten die oben genannten Endpunkte erfassen.

Endpunkte als Wirkindikatoren

Neben den oben genannten populationsrelevanten Endpunkten gibt es Gruppen von *in vivo*-Endpunkten, die physiologische Wirkungen schneller oder einfacher anzeigen, oder die wichtige Hinweise auf den Wirkmechanismus geben können. Zu diesen gehören morphometrische Erfassungen wie Gewichts- und Längenentwicklung und aus diesen errechnete verschiedene Indizes (z.B. gonado-somatischer Index), histopathologische Untersuchungen etwa der Gonaden oder der Leber, sowie die Untersuchung von Biomarkern mit molekularbiologischen oder proteinbiochemischen Methoden (z.B. Vitellogenin).

Diese Wirkindikatoren sind nützlich für die Gewinnung erster Hinweise auf endokrine Wirkungen im Freiland (Wirkmonitoring) und in Kurzeitests zum *in vivo*-screening. Bei der Verwendung von Ergebnissen für Entscheidungen im regulativen Zusammenhang muss sichergestellt sein, dass keine falsch negativen Ergebnisse vorliegen. Das ist letztlich nur möglich, wenn die grundsätzliche Aussagekraft der Wirkindikatoren im Vergleich zu populationsrelevanten Wirkungen festgestellt wurde. In Verbindung mit populationsrelevanten Endpunkten können Wirkindikatoren ihrerseits die wirksspezifische Interpretation und kausale Zuordnung von populationsrelevanten Wirkungen erleichtern.

Ziel dieser Präsentation ist die Darstellung einer möglichen Teststrategie für die Erkennung und Bewertung von Chemikalien mit endokriner Wirkungen auf Fische, welche sich zunächst an der maximalen Testbarkeit derartiger Wirkungen orientiert, um von dort aus Anforderungen an eine gestufte Teststrategie abzuleiten.

Der „Golden Standard“ der Chemikalienprüfung mit Fischen: Full Life Cycle- und/oder Zwei-Generationen Test

Als ultimatives Testverfahren für Fische, welches alle wesentlichen populationsrelevanten Endpunkte erfasst, gilt der Test über den gesamten Lebenszyklus (Full Life Cycle Test). Es existieren verschiedene vorläufige Prüfprotokolle, die sich im Umfang der erfassten Generationen, Lebensstadien und -leistungen, sowie Endpunkte unterscheiden (Abbildung 1).

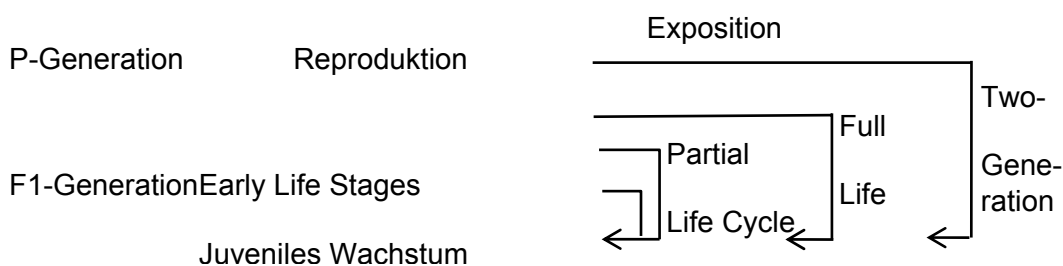


Abbildung 1. Lebenszyklustests mit Fischen

Full Life Cycle Tests werden schon seit geraumer Zeit für die Endbewertung von Chemikalien vorgeschlagen (Nagel 1988), konnten sich aber bislang nicht durchsetzen. Mit dem Problemfeld endokrin wirksamer Substanzen entwickelten sich jedoch Fragestellungen bezüglich langfristiger Wirkungen niedriger Konzentrationen auf die populationsrelevanten Lebensleistungen Generationsdauer, Sexualentwicklung und Reproduktion, welche nur in Lebenszyklustests bearbeitet werden können. Dabei wird eine Belastung über die gesamte Lebensdauer mit potenziellen Auswirkungen auf alle Lebensleistungen erst im Full Life Cycle Test (Nagel 1988, Wenzel und Schäfers 2001) sichergestellt, die zusätzliche Untersuchung des maternalen Transfers von Wirkungen nur im Two-Generation Test (OECD 2002) geleistet.

Die Dauer und Arbeitsintensität des Tests reduziert die geeigneten Fischarten auf diejenigen, deren Generationsdauer annehmbar kurz ist und mit denen genügend Erfahrungen in Zucht, Hälterung und Testung vorliegen. Dies sind zur Zeit vor allem die im englischen und nordamerikanischen Einflussgebiet bevorzugte Dickkopfelritze *Pimephales promelas* (Fathead minnow), der in Japan verwendete Reisfisch *Oryzias latipes* (Medaka) und der in der europäischen Chemikalienprüfung gebräuchliche Zebrabärbling *Danio rerio*. Alle drei Arten haben Vorzüge und Nachteile, die jedoch von geringerer Bedeutung sind als nationale Vorlieben und Gewohnheiten. So ist die OECD bemüht, Testprotokolle zu erstellen und zu validieren, die für alle drei Fischarten gleichermaßen geeignet sind, was bei den teilweise großen Unterschieden in Generationsdauer, Größe, Sexualentwicklung, Balzverhalten und Reproduktionsleistung nicht einfach ist. Zudem wird die Einbeziehung des dreistacheligen Stichlings (*Gasterosteus aculeatus*) und der amerikanische Brackwasser bewohnenden Schafskopfelritze (*Cyprinodon variegatus*) diskutiert.

Beispiele endokriner Wirkungen auf Fische: Populationsrelevante Endpunkte vs Vitellogenin

Beispiel für Rezeptor-Interaktionen: (Xeno-)Östrogene

Die ersten beschriebenen endokrinen Wirkungen in der Umwelt waren auf Östrogenrezeptor-Agonisten zurückzuführen. Da die aufkommenden Forschungsprojekte zum Thema endokrine Wirkungen im Wesentlichen auf die östrogen wirksamen Substanzen fokussiert waren, liegen zu diesen auch die umfangreichsten Ergebnisse vor.

Populationsrelevante Endpunkte

Als empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt der Wirkung von Östrogenrezeptor-Agonisten in Life Cycle Tests hat sich bei den Testarten Zebrabärbling und Dickkopfelritze die Befruchtungsrate erwiesen (Wenzel und Schäfers 2001, Young et al. 2005, Parrott et al. 2005). Die Befruchtungsrate nimmt von 85-95% innerhalb eines kurzen Konzentrationsintervalls auf Werte deutlich unter 50% ab (Abbildung 2). Diese Wirkung ist damit sowohl durch eine steile Konzentrations-Wirkungsbeziehung gekennzeichnet als auch durch eine hohe statistische Schärfe, da die Befruchtungsrate der Kontrollen einen Variationskoeffizienten von nur etwa 5% aufweist.

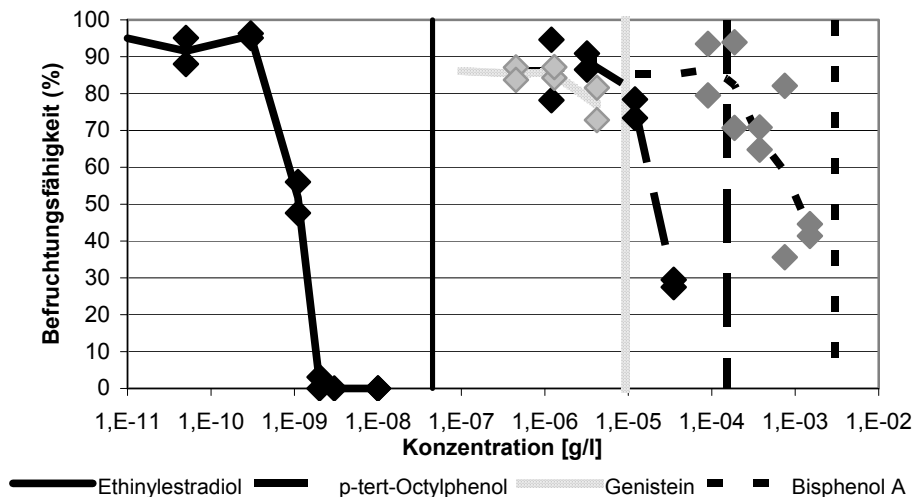


Abbildung 2. Empfindlichste populationsrelevante Wirkungen östrogen wirksamer Substanzen in Full Life Cycle Tests mit *Danio rerio*. Senkrechte Linien: LC10 des empfindlichsten Lebensstadiums

Wirkindikator: Vitellogenin-Induktion in männlichen Zebraabärblingen

In den erwähnten Life Cycle Tests mit dem stärksten Östrogen Ethinylestradiol und dem schwächsten Östrogen Bisphenol A wurde auch die Vitellogenin-Induktion in männlichen Zebraabärblingen durch Messungen von Blutproben bestimmt. In beiden Fällen war dieser Endpunkt ebenso empfindlich wie der empfindlichste populationsrelevante Endpunkt, die Befruchtungsrates, und kann damit als empfindlicher Indikator für populationsrelevante Wirkungen gelten. Im Vergleich zwischen der Exposition im Life Cycle Test und einer Messung nach Kurzzeit-Exposition über 14 Tage zeigte sich eine vergleichbare Empfindlichkeit dieses Wirkindikators (Abbildung 3).

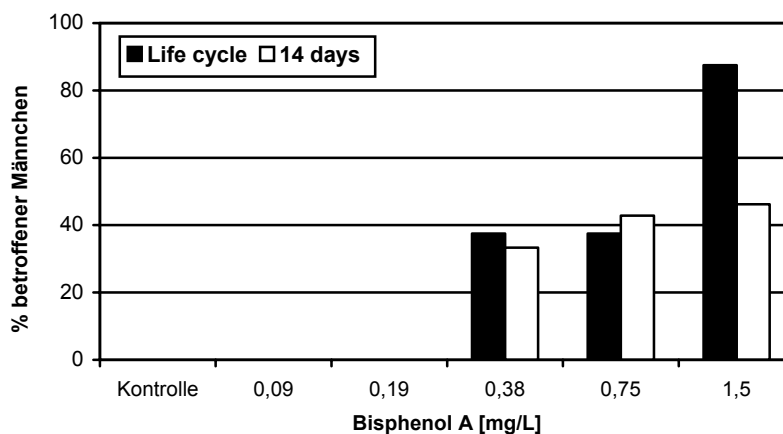


Abbildung 3. Vitellogenininduktion in männlichen Zebraabärblingen nach Belastung mit dem schwachen Xenöstrogen Bisphenol A. Abgetragen ist der Prozentsatz an Männchen mit Vitellogenin-Konzentrationen im Blutplasma oberhalb des Bereichs der Kontrolltiere nach Belastungen während der gesamten Lebensdauer und über lediglich 14 Tage.

Artvergleich

Im Vergleich von Testergebnissen mit verschiedenen Fischarten zeigt sich, dass bei dem starken Östrogen Ethinylöstradiol sehr ähnliche Schwellenkonzentrationen von Wirkungen

erzielt werden (Tabelle 1). Dies gilt für den Biomarker Vitellogenininduktion in Männchen ebenso wie für die populationsrelevanten Endpunkte Befruchtungsrate und Geschlechterverhältnis. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in Fischarten verschiedener Familien (Salmonidae, Cyprinidae, Oryziatidae) die Aufnahme- und Verteilungsprozesse zu ähnlichen Konzentrationsverhältnissen am primären Wirkort, dem Östrogenrezeptor, führen. Die Ausprägung der Folgewirkungen auf populationsrelevante Endpunkte mag dann unterschiedlich sein, ist aber nicht in allen Fischarten vergleichbar untersucht worden.

Tabelle 1. Wirkungen des starken Östrogens Ethinylestradiol bei verschiedenen Testspezies

Endpunkt	Fischart	LOEC	NOEC	EC50	EC10
Vitellogenin in Männchen (Wirkindikator, Kurzzeittests)	Zebrabärbling	1 ng/L			
	Dickkopfritze ¹	1 ng/L			
	Regenbogenforelle ²	0.3-1 ng/L			
Befruchtungsrate (Life Cycle Test)	Zebrabärbling ^o			1 ng/L	0.6 ng/L
	Dickkopfritze ³			1 ng/L	0.3 ng/L
Geschlechterverhältnis (Life Cycle Test)	Dickkopfritze ⁴	4 ng/L	1 ng/L		
	Medaka ⁵	10 ng/L	1 ng/L		

^oWenzel und Schäfers 2001; ¹Pawlowski et al. (2004); ²Sheahan et al. (1993); ³Parrott et al. (2005); ⁴Länge et al. (2001); ⁵Scholz und Gutzeit (2000)

Beispiel für Enzym-Inhibition: Aromatase-Hemmer

Die Aromatase katalysiert die Bildung des weiblichen Sexualhormons 17-beta-Östradiol aus Testosteron. Ihre Inhibition führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses der aktiven Formen der männlichen und weiblichen Geschlechtshormone und zu einer Vermännlichung. Dieser Mechanismus liegt zum Beispiel bei Azol-Fungiziden nahe, die die Ergosterol-Synthese in der Zellwand der Zielorganismen hemmen sollen, die als Cytochrom p-450 Oxygenase Ähnlichkeit mit Enzymen des Steroid-Stoffwechsels hat, wie z.B. der Aromatase oder der 11-Hydroxylase, welche in Fischen die Synthese von 11-keto-Testosteron als aktivem männlichen Geschlechtshormon katalysiert.

Populationsrelevante Endpunkte

Als empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt der Wirkung eines Azol-Fungizids im Life Cycle Test mit dem Zebrabärbling erwies sich das Geschlechterverhältnis. Der Weibchenanteil nahm von 40-60% in einer klaren Konzentrations-Wirkungs-Beziehung auf 0% ab (Abbildung 4). Die Anzahl produzierter Eier pro verbliebenem Weibchen und die Befruchtungsrate waren nicht beeinflusst.

Wirkindikator: Vitellogenin-Reduktion in weiblichen Zebrabärblingen

Im erwähnten Life Cycle Test mit dem Aromatase-Hemmer wurde auch die Vitellogenin-Konzentration im Blut adulter Zebrabärblinge bestimmt. Der Schwellenwert für eine Erniedrigung in Weibchen (Abbildung 4) war in etwa so empfindlich wie der empfindlichste populationsrelevante Endpunkt, das Geschlechterverhältnis, und kann damit als empfindlicher Indikator für populationsrelevante Wirkungen gelten. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung war allerdings deutlich weniger steil.

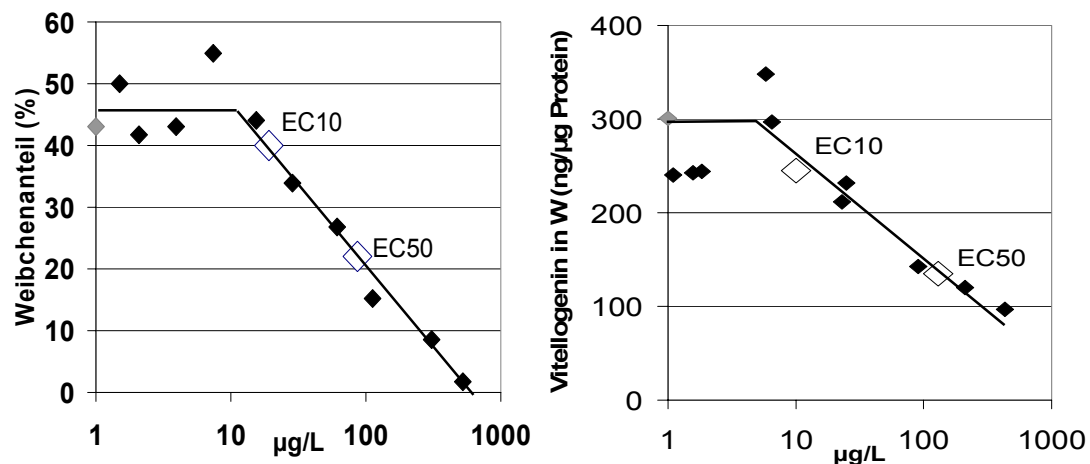


Abbildung 4. Empfindlichste populationsrelevante Wirkungen (links) und Wirkung auf die Vitellogeninkonzentration in weiblichem Blut (rechts) im Full Life Cycle Test mit *Danio rerio* und einem Aromatase-Hemmer.

Artvergleich

Während der Validierungsphase 1B des OECD Fish Screening Assays für endokrine Effekte wurden die Testfischarten Medaka, Zebraquarienfisch und Dickkopflurche auch mit dem Azol-Fungizid Prochloraz belastet. Identische Prochloraz-Exposition führte zu einer dosis-abhängigen Senkung des VTG-Spiegels bei Weibchen aller drei getesteten Fischarten, die mit einer Laichhemmung der Gruppen einherging.

OECD Validierung eines Screening-Tests

Zur Feststellung des sexual-endokrinen Wirkpotenzials chemischer Substanzen auf aquatische Vertebraten wird zurzeit ein 21d Fish *in-vivo*-Screening Assay als OECD Testverfahren validiert. Mit diesem sollen Stoffe, für die sich in einem noch nicht näher geklärten Eingangsverfahren Verdachtsmomente auf endokrine Wirkungen ergeben haben, geprüft werden. Ziel ist eine sichere Indikation sexual-endokriner Wirkungen, die mit Daten aus weitergehenden Testverfahren (Endstufe: Zwei-Generationen-Test) bewertet werden sollen. Es wurden ein schwaches Östrogen, ein schwacher Aromatase-Hemmer und ein Anti-Androgen untersucht. Die diskutierten Endpunkte, ihre Empfindlichkeit und Relevanz sind in Tabelle 2 dargelegt.

Tabelle 2. Endpunkte, die im Rahmen der Validierung des 21d Fish Screening Assays diskutiert wurden und werden

Endpunkt	Empfindlichkeit	Relevanz für Teststrategie
Morphologie und sekundäre Geschlechtsmerkmale	Mäßig, für Zebrafisch ungeeignet	Einfach zu erheben, für Dickkopflurche und Medaka relevant
Gonadosomatischer Index	In frühen Phasen als zu unempfindlich befunden	Irrelevant
Histopathologie	Problematisch durch unklare Quantifizierung, in Phase 1B einziger ansprechender Endpunkt für anti-androgene Effekte	Sehr kausalstark, sehr aufwändig. Relevanz wird noch diskutiert, abhängig von angestrebtem Aussagewert des Tests
Vitellogenin-Konzentration	Beste Empfindlichkeit bei Östrogen-Rezeptor-Agonisten und Aromatase-Hemmern, keine Reaktion bei Anti-Androgenen	Höchste Relevanz, aber nicht ausreichend
Laichstatus (täglich: ja/nein)	Schwach	Relevanz für Bewertung der Testqualität
Fekundität, Fertilität (quantitative Erfassung)	Mäßig im 21 d-Test	Hohe Relevanz für Populationen, aufwändig; wird noch diskutiert, abhängig von angestrebtem Aussagewert des Tests
11 keto-Testosteron-Konzentration*	Beste Empfindlichkeit bei Anti-Androgenen	Höchste Relevanz, zusammen mit Vitellogenin möglicherweise ausreichend, noch nicht auf OECD-Ebene diskutiert

* Nicht Teil der Phase 1B, vom Fraunhofer IME zusätzlich bestimmt (Schäfers und Teigeler 2005)

Effektmatrix Fraunhofer IME

Zur Abklärung der relativen Empfindlichkeit von Wirkindikatoren und populationsrelevanten Endpunkten wurden und werden am Fraunhofer IME Tests mit repräsentativen Stoffen für alle wesentlichen sexual-endokrinen Wirkmechanismen durchgeführt. Dabei werden in Kurzzeittests über 14 oder 21 Tage die Biomarker Vitellogenin und 11-keto-Testosteron im Blut gemessen, sowie Fekundität und Fertilität erfasst. Ziel ist zum einen die Erkennung von Effektsyndromen, die eine Einschätzung des Mechanismus und eine Fokussierung weiterführender Tests ermöglichen könnte (Tabelle 3). Zum anderen soll geklärt werden, ob für die Biomarker in Kurzzeittests in allen Fällen sichergestellt werden kann, dass keine falsch negativen Resultate erzielt werden. Die Versuche mit Flutamid als Androgenrezeptor-Antagonist laufen zurzeit, die Versuche mit dem Östrogenrezeptor-Antagonisten und Trenbolon als Androgenrezeptor-Agonist sind bis Mitte 2006 geplant. Für die anderen Wirkmechanismen (Östrogenrezeptor-Agonisten und spezifische Steroid-Synthesehemmungen) war die Biomarker-Antwort in Kurzzeit-Tests ähnlich empfindlich wie der empfindlichste endokrin beeinflusste populationsrelevante Endpunkt im Life Cycle Test (Tabelle 4).

Tabelle 3. Effektsyndrome für Zebraabürblinge nach Belastung mit verschiedenen sexualendokrinen Stoffen; + Zunahme; - Abnahme; 0 kein Effekt

Wirkmechanismus	Stoff (-gruppe)	Kurzzeit-Test			Life Cycle Test		
		VTG	11-kT	Reproduktion	VTG	11-kT	Population
ÖR-Agonist	stark EE2	+	-	Befruchtung	+	n.b.	Befruchtung,
	Alkylphenol	+	-	Befruchtung	+	n.b.	Entwicklungszeit
	schwach BPA	+	-		+	n.b.	Befruchtung
ÖR-Antagonist							
AR-Agonist	Trenbolon						
AR-Antagonist	Flutamid	0	+	Eizahl			Eizahl
Aromatasehemmer	Fadrozol	-	+	Eizahl	n.b.	n.b.	n.b.
	Azol-Fungizid	-	(-)	Eizahl	-	(-)	Sex ratio
Testosteronsynthese-Hemmer	3,4-DCA	-	-		n.b.	-*	Eizahl (ELS)
	Atrazin		-		-**		Eizahl**

VTG: Vitellogenin; 11-kT: 11-keto-Testosteron; n.b. nicht bestimmt; offene Felder: Daten in Arbeit; ÖR: Östrogenrezeptor; AR: Androgenrezeptor; EE2: Ethinylöstradiol; BPA: Bisphenol A; Alkylphenol: tert-Pentylphenol im Kurzzeittest, p-tert-Octylphenol im Life Cycle Test; * Allner 1997: 11-kT-Inhibition im Stichling; ** Nagel et al. 2004

Tabelle 4. Effektkonzentrationen für Zebraabürblinge nach Belastung mit verschiedenen sexualendokrinen Stoffen

Wirkmechanismus	Stoff (-gruppe)	Kurzzeit-Test (Biomarker)		Life Cycle Test (Population)	
		EC10	EC50	EC10	EC50
ÖR-Agonist	stark EE2	1.1 ng/L	3.1 ng/L	0.6 ng/L	1.1 ng/L
	schwach BPA _{initial}	375 µg/L	639 µg/L	390 µg/L	1410 µg/L
ÖR-Antagonist					
AR-Agonist	Trenbolon				
AR-Antagonist	Flutamid	47 µg/L	700 µg/L	256 µg/L	740 µg/L
Aromatasehemmer	Azol-Fungizid	22 µg/L	49 µg/L	19 µg/L	86 µg/L
Testosteronsynthese-Hemmer	3,4-DCA	96 µg/L	152 µg/L	117 µg/L*	141 µg/L*
	Atrazin	67 µg/L	730 µg/L	n.b.	30-4270 µg/L**

* Rohdaten aus Ensenbach 1991, nur Eiproduktion (ELS empfindlicher); ** Nagel et al. 2004; n.b. nicht bestimmt; offene Felder: Daten in Arbeit

Fazit: Gestufte Teststrategie für Fische

Als Fazit aus den vorangestellten Ausführungen wird eine gestufte Teststrategie für aquatische Wirbeltiere hinsichtlich der Feststellung und Bewertung sexual-endokriner Wirkungen vorgeschlagen. Dabei sind folgende Kriterien von zentraler Bedeutung:

1. Die Möglichkeit falsch negativer Befunde sollte unter allen Umständen minimiert werden. Es darf keine endokrin wirksame Substanz, die ein Risiko darstellen könnte, durch das Beobachtungs- und Bewertungsraster fallen.
Kein Einstieg in die Betrachtung erst bei begründetem Verdacht!
2. Auf den unteren Stufen sollte der Aufwand auf die Erhebung von Daten reduziert werden, die für die Auslösung weitergehender Untersuchungen notwendig sind. Nur so kann gewährleistet werden, dass umfassende Prüfungen und Bewertungen durchgeführt werden. Keine wissenschaftliche Mechanismenforschung in Screening-Tests!
3. Die Möglichkeit falsch positiver Befunde sollte eingeschränkt werden; 1. hat aber Vorrang. Keine Überregulation auf Kosten einer sinnvollen Ressourcennutzung!

Auf Basis der vorliegenden Informationen und vorbehaltlich einer weiteren Bestätigung durch die bis 2006 durchgeführten Studien scheint daher folgendes Stufenkonzept ausreichend:

Stufe	Methode	Ziel
Basisstufe	SAR; Informationen aus Anwendung; <i>in vitro</i> -Screening (z.B. Rezeptor-Assays)	Identifikation des Potenzials zu endokrinen Wirkungen (ED)
Stufe 1	<i>in vivo</i> -Screening (OECD 21d-Test) Biomarker-Endpunkte VTG und 11-kT	Identifikation von ED bei relevanten Konzentrationen
Stufe 2	Zwei-Generationen-Test	Hazard assessment (Relevanz für Populationen)

Basisstufe. Unklarheit herrscht über die Ausfüllung der Basisstufe, in welcher Verdachtsmomente gesammelt werden, die zu weiteren Prüfungen führen. Struktur-Wirkungs-Analysen (SAR) sind zurzeit noch sehr unsicher. Eine Selektion von Descriptoren, die im Wesentlichen falsch positive Resultate erzeugen, aber deren negative Resultate verlässlich sind, scheint vertretbar. Informationen aus Anwendungen sind auf Wirkstoffe (Arznei- und Pflanzenschutzmittel) beschränkt. Rezeptor-Assays wiederum prüfen nur begrenzte Fragestellungen ab. Eine Einbeziehung aller Wirktypen einschließlich der Enzymhemmungen wäre notwendig. Kann ein Verdacht durch ausreichende Voruntersuchungen nicht ausgeschlossen werden, werden Untersuchungen auf der Stufe 1 notwendig.

Stufe 1. Auf dieser Stufe soll geklärt werden, ob endokrine Wirkungen in lebenden Fischen nach Exposition über die Wasserphase nachweisbar sind. Der in der Validierung befindliche Test umfasst einige Endpunkte, die für seine Aufgabe als Zwischenstufen-Prüfung in der Aussage redundant und in der Durchführung zu aufwändig erscheinen. Es deutet bislang alles darauf hin, dass die Untersuchung der Biomarker Vitellogenin und 11-keto-Testosteron, die beide als kommerzielle ELISA-Testkits erhältlich sind, im Blut von

männlichen und weiblichen Fischen zur Auslösung der Stufe 2 ausreichend sind. Es gibt bislang keine Hinweise auf falsch negative oder falsch positive Ergebnisse. Dies ist jedoch durch weitere Ergebnisse abzusichern. Auch scheint eine Exposition über 14 Tage für eine Biomarker-Antwort auszureichen; allerdings sollte auf eine standardisierte OECD-Guideline zurückgegriffen werden.

Stufe 2. Auf dieser Stufe soll die endokrine Wirkung der getesteten Substanz bezüglich ihrer Populationsrelevanz quantifiziert werden. Dies geschieht am sichersten mittels eines Zwei-Generationen-Tests. Eine Zwischenstufe zwischen OECD 21d-Test und Zwei-Generationen-Tests ist überflüssig, da die Biomarker-Antworten schon qualitative Vorausagen für populationsrelevante Wirkungen möglich machen. Es stellt sich allerdings die Frage, ob auf der Stufe 2 ein Zwei-Generationen-Test immer notwendig ist, oder ob bei gut bekannten Wirkmechanismen auch reduzierte Testverfahren ausreichen.

Weitere Testverfahren. In der Diskussion für weitere Testverfahren mit Fischen befinden sich

- eine Erweiterung des 21 d Screening-Tests um Fekundität/Fertilität/Histopathologie,
- ein 60-90 d Gonadal Development Test (eingebracht von Skandinavien),
- ein Short-term Reproduction Test (eingebracht von den USA).

Bei allen Tests ist die anvisierte Aufgabe in einer Teststrategie nicht klar. Handelt es sich um die Erfüllung von Forderungen nach aufwändigerem Screening? Um die Erhebung sinnvoll erachteter Zusatzdaten zur Erleichterung von Interpretationen? In beiden Fällen sei auf die Aufgabe von Screening-Tests verwiesen. Eine Verschiebung des Zieles hin zu einem allgemeinen Screening auf Entwicklungs- und Reproduktionstoxizität bedarf einer neuen Zieldefinition. Sollen die Tests als Zwischenstufentests dienen? Erkenntnistheoretisch haben Zwischenstufentests das Problem, dass sie entweder ebenso positiv anschlagen wie der Test der Vorstufe (keine neuen Erkenntnisse), oder dass sie negative Resultate zeitigen, die möglicherweise durch Ausschluss eines empfindlichen Lebensstadiums oder einer empfindlichen Lebensleistung zustande gekommen sind (falsch negatives Ergebnis). Oder ist das Ziel der Testverfahren ein Ersatz für den Zwei-Generationen-Test als Endstufe-Test? Ein solches Ziel müsste jedoch klar formuliert sein. Es müssten abgestimmte notwendige Vorinformationen über Wirkmechanismen und Kausalketten populationsrelevanter Wirkungen vorliegen. In einem solchen Fall ist die Beschränkung auf den nachgewiesenermaßen empfindlichsten Endpunkt Sexualentwicklung oder Reproduktion vertretbar.

Literatur

- Allner B (1997) Toxikokinetik von 3,4-Dichloranilin beim dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus*) unter besonderer Berücksichtigung der Fortpflanzungsbiologie. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Ensenbach U (1991) Kinetik und Dynamik von Fremdstoffgemischen beim Zebrafisch (*Brachydanio rerio*). Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Länge R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH, Sumpter JP (2001) Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (6): 1216-1227.
- Nagel R (1998) Der Vollständige Life Cycle Test (Complete Life Cycle Test, CLC-Test) mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*, vormalig *Brachydanio rerio*). Entwurf. UBA-Texte 58/98: 166-175.

- Nagel R, Luwichowski KU, Oetken M, Schmidt J, Jackson P, Petersen G, Meller M, Eberling M, Tomczyk S, Schallnass HJ, Knacker T, Boshof U, Teigeler M, Schäfers C, Schwaiger J, Triebkorn R (2004) Ringtest zur Validierung der Prüfrichtlinie Fish Life-Cycle Test mit dem Zebraäbrbling (*Danio rerio*). Forschungsbericht FKZ 200 67 411, Umweltbundesamt Berlin, 141 S.
- OECD (2002): Draft proposal for a new guideline: fish two-generation test guideline.
- Parrott J, Blunt B, Sullivan C, Rhodes S (2005) Endocrine disrupting effects in fathead minnows exposed for a lifecycle to pharmaceuticals and municipal waste water effluent. Poster-Präsentation anlässlich der 15. Jahrestagung der SETAC Europe in Lille, 22.-26. Mai 2005.
- Pawlowski S, van Aerle R, Tyler CR, Braunbeck T (2004) Effects of 17(alpha)-ethynylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57 (3): 330-345.
- Schäfers C, Teigeler M (2005) Validierung des 21-Tage Fischtests zur Erfassung von endokrin-wirksamen Stoffen. Forschungsbericht FKZ 203 65 420/02, Umweltbundesamt Berlin, 42 S.
- Scholz S, Gutzeit HO (2000) 17 α -ethynylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 50: 363-373.
- Sheahan DA, Bucke D, Matthiessen P, Sumpter JP, Kirby MF, Neall P, Waldock M (1994) The effects of low levels of 17 α -ethynylestradiol upon plasma vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* held at two acclimation temperatures. Presentation at the 17th Session of EIFAC 1992, published in: Müller, R., Lloyd, R. (eds) *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Fishing News Books, Blackwell Science Ltd., Oxford, Great Britain, 99-112.
- Wenzel, A., C. Schäfers (2001). Research efforts towards the development and validation of a test method for the identification of endocrine disrupting chemicals. Forschungsbericht EU DG 24, B6-7920/98/000015.
- Wenzel, A., C. Schäfers (2002). From population relevant endpoints to biomarkers – a testing strategy for EDCs. Vortrag anlässlich des 12th SETAC Europe Annual Meeting, Vienna, Austria, 12.-16.05.2002.
- Young, W., P. Whitehouse, I. Johnson and G. Brighty (2002). Steroid oestrogens: Environmental thresholds for the protection of freshwater life. WRC-NSF R&D Technical Report P2-T04/1. Poster at 12th Annual Meeting SETAC Europe. Wien 12.-16. Mai 2002.

Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System - Von der Testung zur Bewertung in der Ökotoxikologie

Radke, K.¹, Zok, S.²

¹BASF AG Ludwigshafen, GUP/CB Z470, 67056 Ludwigshafen

²BASF AG Ludwigshafen, GV/TC Z570, 67056 Ludwigshafen

Einleitung

Im Rahmen des Vortrages beim 3. UBA Statusseminar zum Thema „Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System – Wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung“ wurde ein Überblick über den derzeitigen Entwicklungsstand von Teststrategien und den dafür notwendigen, zu etablierenden Testmethoden gegeben, die eine regulatorische Bewertung von Umweltchemikalien erlauben. Darüber hinaus wurden aktuelle Forschungsergebnisse aus laufenden Projekten der „Long-range research initiative LRI“ des Verbandes der europäischen chemischen Industrie (CEFIC) zur Entwicklung und Validierung von Testmodellen für endokrin vermittelte Schadeffekte auf Schlüsselarten im aquatischen Bereich vorgestellt.

In der Ökotoxikologie sind für Substanzen mit potentieller endokriner Wirkung zahlreiche Testmethoden in der Entwicklung. Im Rahmen dieser Methoden werden auch neue Biomarker (z.B. biochemische und molekularbiologische Parameter) untersucht, für die jedoch nur teilweise die Umwelt- und Populationsrelevanz geklärt ist. Die Entwicklung und Validierung von Testmethoden sollten vorrangig im Rahmen einer klar definierten Teststrategie durchgeführt werden. Dabei bietet es sich gerade im Bereich der endokrin vermittelten Schadeffekte an, toxikologische und ökotoxikologische Ergebnisse gemeinsam zu betrachten. Wenn bereits Kenntnisse, beispielsweise zum Wirkmechanismus eines potentiellen endokrinen Disruptors vorliegen, kann die Zahl der erforderlichen Untersuchungen verringert werden, was nicht zuletzt unter dem Gesichtspunkt der Reduktion von Tierversuchen erforderlich ist.

Für eine regulatorische Bewertung sollten nur adverse Effekte herangezogen werden, also solche, die mit einer Schädigung gleichzusetzen sind bzw. eine eindeutige Schädigung für die Population nach sich ziehen. Entsprechend sollten Biomarker nur dann für eine Bewertung herangezogen werden, wenn ein eindeutiger Zusammenhang mit einer Schädigung wahrscheinlich ist. Des Weiteren sollten sich die Ergebnisse aus Untersuchungen zu endokrin vermittelten Schadwirkungen in bestehende Bewertungskonzepte weitestgehend einfügen. Hierbei steht die Risikobewertung und die Ermittlung von Wirkungsschwellen im Vordergrund. Dies bedeutet auch, dass bei der Testung Kenntnisse zur Expositionssituation berücksichtigt werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kommt man nicht umhin, in die Bewertung auch Ergebnisse aus nicht standardisierten bzw. nicht validierten Testverfahren einzubeziehen. Bei der Verwendung im regulatorischen Kontext müssen jedoch bestimmte Mindestanforderungen hinsichtlich der Qualität und Validität unbedingt erfüllt werden.

Der Entscheidungsbaum des VCI als Teststrategie

Das „Conceptual Framework“ der OECD zur Testung substanzvermittelter endokriner Wirkungen (OECD 2005) bietet eine Vielzahl von Tests auf verschiedenen Ebenen – Biomarker, Zellsysteme, bis hin zur Population - an. Im Rahmen dieser Untersuchungen können bestimmte endokrin vermittelte Schädwirkungen erfasst werden. Spätestens auf der höchsten Stufe (Level 5) ist die Ermittlung von Wirkschwellen vorgesehen, die dann in bestehende Risikobewertungen eingehen. Das OECD - Konzept bildet damit jedoch keine Teststrategie ab, die vorgibt, welches Testsystem unter welchen Voraussetzungen sinnvollerweise Anwendung findet.

Der Verband der chemischen Industrie (VCI) hat einen Entscheidungsbaum als Basis für eine Teststrategie entwickelt, der als Leitfaden für die Erfassung und Bewertung von endokrinen Schädwirkungen herangezogen werden kann und der die Tools des OECD „Conceptual Framework“ aufgreift (Abbildung 1). Hier wie dort steht eine hohe Flexibilität des Systems im Vordergrund, die es ermöglicht, die Bewertung auf verschiedenen Ebenen zu beginnen. Dem Einstieg in diesen Entscheidungsbaum vorangestellt ist die Prüfung der vorhandenen Information bezüglich einer zu bewertenden Substanz. Enthält diese Information keinen Hinweis auf eine mögliche endokrine Aktivität der Substanz (beispielsweise aus *in vitro* assays wie Rezeptorbindungsstudien, aus Screening-Tests der Säugertoxikologie, aus der Literatur oder aus Studien mit „Nicht-Standardorganismen“), so ist von umfangreichen Prüfungen abzusehen. Besteht ein Verdacht auf ein endokrin vermitteltes Wirkpotential, ist zu berücksichtigen, welcher Exposition Organismen in der Umwelt gegenüber diesem Stoff ausgesetzt sind. Sofern dies in relevantem Umfang zu erwarten ist, ist der Einstieg in den Entscheidungsbaum geboten.

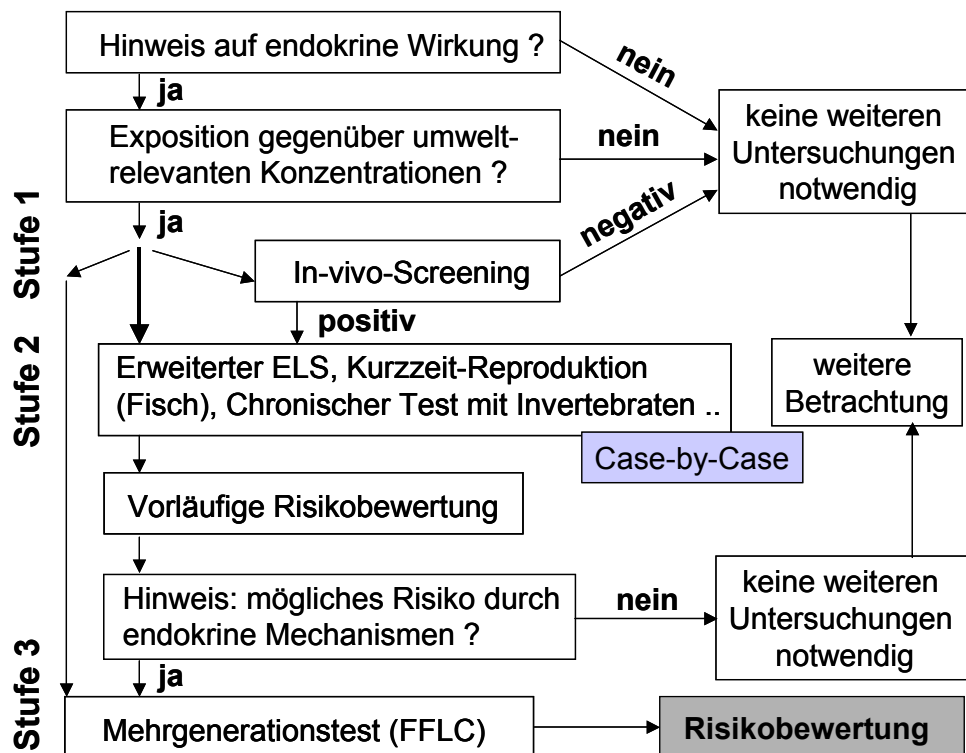


Abbildung 1. Entscheidungsbaum für Substanzen mit potentieller endokriner Wirkung (VCI)

In Stufe 1 des Entscheidungsbaums wird die Durchführung von *In vivo* Screening-Assays vorgeschlagen. Tests auf dieser Stufe sollten dem Anspruch genügen, in Abgrenzung von toxischer Wirkung ein eindeutiges endokrines Potential aufzuzeigen, um unnötige (*in vivo*-) Versuche zu vermeiden. Hier ist für den Umweltbereich mit dem entwickelten Fisch-Screening Assay (FSA) ein vielversprechendes Studienkonzept zu nennen. Der Fisch ist als ein bedeutender Repräsentant der oviparen aquatischen Organismen für derartige Untersuchungen sehr gut geeignet.

Wird der Hinweis auf ein endokrines Wirkpotential durch Studien der Stufe 1 nicht bestätigt, sind keine weiteren Untersuchungen erforderlich. Liegt ein positiver Befund aus Stufe 1 vor, kann die Einschätzung der Substanz hinsichtlich ihres endokrinen Potentials mit den in Stufe 2 vorgeschlagenen Testverfahren erweitert werden. Hierzu zählt der erweiterte ELS Test (extended Early Life Stage Test), indem in ein bereits existierendes und etabliertes Testprotokoll weitere Endpunkte wie Histopathologie zur Geschlechtsdifferenzierung oder Vitellogenin-Induktion integriert werden. In einem Kurzzeit-Reproduktionstest mit Fischen können neben den letztgenannten Parametern auch die Anzahl der produzierten Eier pro weiblichem Elterntier erfasst werden. Nach Möglichkeit sollten die Resultate dieser verkürzten Testverfahren die Ermittlung von Wirkschwellen zulassen, so dass aussagefähige Daten in eine vorläufige Risikobewertung einfließen können.

Die Entscheidung, welcher Test auf Stufe 2 durchgeführt wird, erfolgt auf „Case by Case“-Basis und spezifisch in Abhängigkeit vom vermuteten Wirkmechanismus der Substanz, der durch die Studie adäquat adressiert werden sollte. So kann für Stoffe, die möglicherweise das Schilddrüsensystem beeinflussen, auch ein Metamorphose-Test am Krallenfrosch (Xenopus Metamorphosis Assay, XEMA) in Erwägung gezogen werden. Stoffe, für die durch die verkürzten Studien auf Stufe 2 der Verdacht auf endokrine Einflussnahme auf die Reproduktion nicht ausgeräumt wurde, werden schließlich auf Stufe 3 Tests zur Ermittlung von Effekten auf Populationsebene vorgeschlagen. Die hierfür verwendeten Spezies sollten vorzugsweise den in den entsprechenden Tests der Stufe 2 entsprechen und sich am gegebenen Expositionsszenario orientieren.

Alle durchzuführenden Tests sollten hinsichtlich ihrer Akzeptanz und dem Grad der Validierung ausgewählt werden, damit anhand der ermittelten Ergebnisse eine komplette Risikobewertung vorgenommen werden kann. Für die im Rahmen einer solchen Risikobewertung anzuwendenden Sicherheitsfaktoren muss die Sensitivität und Nachvollziehbarkeit (Reproduzierbarkeit?) der durchgeführten Tests berücksichtigt werden. Des Weiteren empfiehlt sich, bereits vorhandene Standardtestverfahren und die daraus gewonnenen Erfahrungen in die Weiterentwicklung von Testmethoden einzubeziehen, um geeignete Testsysteme gezielt weiterzuentwickeln, um Redundanzen bei Testentwicklung zu vermeiden. Dabei ist es wünschenswert, das Augenmerk gezielt auf die Entwicklung aussagekräftiger und übertragbarer Verfahren mit hoher Umweltrelevanz zu legen, um eine unübersichtliche Vielzahl von Testmethoden, die nur einen kleinen Aspekt in diesem komplexen Kontext abbilden, zu vermeiden. Dies trägt weiterhin zur Reduktion der Tierversuche bei.

Bei der Entwicklung von Testmethoden ist darauf zu achten, dass Zielsetzung, Methode und Ergebnis nachvollziehbar beschrieben sind. Hinsichtlich der Plausibilität müssen die Befunde in sich konsistent sein, eine erklärbare Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegen und die Übereinstimmung mit Ergebnissen aus anderen Studien („Weight of Evidence“) gegeben sein. Für eine Risikobewertung muss die Relevanz der Ergebnisse bei der Bewertung, sowie eventuelle Variabilitäten, z.B. innerhalb der Vergleichsgruppen, berücksichtigt

werden. Außerdem ist zu fordern, dass ein relevanter Effekt in jedem Prüflabor reproduziert werden kann.

Testmethoden – Entwicklungsstand und erste Bewertungen

Validierung von Tests zur Erfassung endokrin vermittelter Schadwirkungen – 1. Fische

Für den aquatischen Bereich ist die Entwicklung von Methoden zur Erfassung von endokrinen Wirkungen mit dem Fisch als Modellorganismus am weitesten fortgeschritten. Die Abbildung 2 gibt einen Überblick, welche Lebensphasen von den unterschiedlichen Studientypen betrachtet werden.

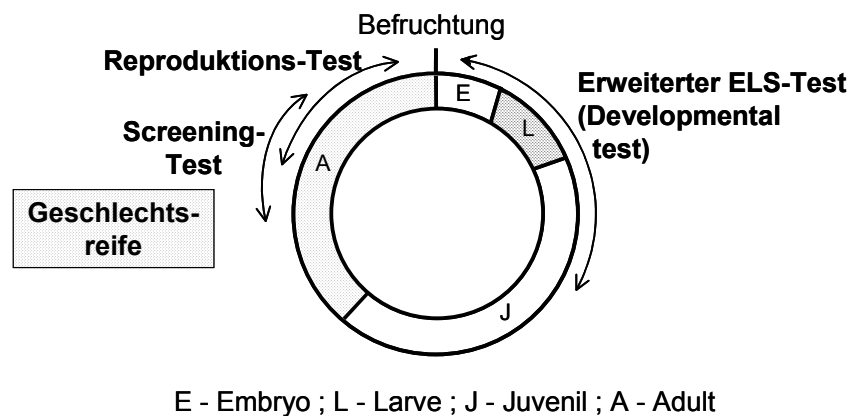


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Testmethoden zur Erfassung endokrin vermittelter Schadwirkung mit Fischen (nach Gimeno et al., 2004)

Der Fisch-Screening-Test (einzuordnen in der Stufe 1 des Entscheidungsbaums) arbeitet mit geschlechtsreifen Elterntieren. Als wichtigste Endpunkte gelten hier die Bestimmung des Dotterproteins Vitellogenin (VTG), die sekundären Geschlechtsmerkmale sowie die histopathologische Untersuchung der Gonaden.

Für Stufe 2 stehen zwei Tests zur Verfügung. Neben dem Kurzzeit-Reproduktionstest, in dem im Unterschied zum Screening-Test die Anzahl der Eier pro Weibchen als zusätzlicher Endpunkt miterfasst wird, kann ein erweiterter Early Life Stage-Test (extended ELS-Test) durchgeführt werden. Die Exposition beginnt hier mit den befruchteten Eiern. Als wichtigste Endpunkte sind Histologie der Gonaden zur Geschlechtsdifferenzierung, VTG-Bestimmung und die Mortalität sowie wachstumsspezifische Parameter zu nennen.

Die Tabelle 1 zeigt vergleichend erste Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Sensitivität der einzelnen Testsysteme im Rahmen dieses mehrstufigen Testkonzeptes an der gleichen Fischart (*Pimephales promelas*, Dickkopf-Elritze). Als Modellsubstanz wurde das schwache Östrogen 4-*tert*-Pentylphenol ausgewählt. Es wurden 5 Konzentrationen untersucht: 0, 56, 180, 320 und 560 µg/l.

Tabelle 1. Vergleich der Sensitivitäten von verkürzten Testverfahren mit *Pimephales promelas* zur Erfassung endokrin vermittelter Schadwirkungen unter Exposition mit 4-*tert*-Pentylphenol

	NOEC [$\mu\text{g/l}$]	LOEC [$\mu\text{g/l}$]	Endpunkte
Screening – Test ^(a)	100	320	Histopathologie, sekundäre Geschlechtsmerkmale, VTG \uparrow
Erweiterter ELS ^(b)	56 [*]	180	Histopathologie: nur „gonadal attachment sites“ bei Männchen
Reproduktionstest	/	/	
FFLC (<i>O. latipes</i>) ^(c)	100	224	Histopathologie, Geschlechterverhältnis

a) Ergebnisse aus OECD Ringtest, 2005; b) Panter et al., 2004, SETAC World, Portland, USA; c) Seki et al., 2003 ;

^{*} fragwürdige Effekte auf den « condition factor » bei weiblichen Tieren wurde hier nicht berücksichtigt, da für diesen Endpunkt keine Dosis-Wirkungs-Beziehung vorlag (FFLC = Fish Full Life Cycle Test, ELS = Early Life Stage, VTG = Vitellogenin)

Im Screening-Test konnte basierend auf den betrachteten Biomarker-Endpunkten (Histologie, sekundäre Geschlechtsmerkmale und VTG-Bestimmung) eine NOEC von 100 und eine LOEC von 320 $\mu\text{g/l}$ ermittelt werden. Im erweiterten ELS Test konnte für den einzigen signifikanten Effekt, die sogenannten „gonadal attachment sites“ bei Männchen, eine NOEC mit 56 $\mu\text{g/l}$ und eine LOEC mit 180 $\mu\text{g/l}$ bestimmt werden. Der zugehörige Reproduktionstest bleibt in seiner statistischen Aussagekraft fraglich, da große Unterschiede in der individuellen Fertilität und damit in der Anzahl der Eier pro Weibchen innerhalb der gleichen Expositionsgruppe auftraten. Zudem wurde eine erhöhte Mortalität, auch in dem Ansatz mit der Lösungsmittelkontrolle, von bis zu 58 % beobachtet.

Da ein kompletter Full Life Cycle Test an der gleichen Fischart noch nicht durchgeführt wurde, wurden zum Vergleich Ergebnisse aus der Studie von Seki et al. (2003) am japanischen Reiskarpfing *Oryzias latipes* herangezogen. Für die dort betrachteten Endpunkte (Histopathologie sowie Geschlechterverhältnis) wurde eine NOEC mit 100 $\mu\text{g/l}$ bzw. eine LOEC mit 224 $\mu\text{g/l}$ an der gleichen Modellsubstanz ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass im vorliegenden Fall des Screening-Tests die Biomarker sensitive und wirkungsspezifische Antworten lieferten. Da die Genauigkeit einer NOEC von den jeweils verwendeten Konzentrationsstufen abhängig ist, müssen diese unbedingt bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Zudem ist die Angabe einer LOEC unerlässlich.

Validierung von Tests zur Erfassung endokrin vermittelter Schadwirkungen – 2. Amphibien

Aus der großen Gruppe der Amphibien ist der Krallenfrosch *Xenopus laevis* ein Vertreter, der auf der Stufe 2 (Abbildung 1, siehe auch Entscheidungsbaum) bei spezifischen Fragestellungen, z.B. für die Erfassung von Effekten von schilddrüsenhemmenden Substanzen, angewendet werden kann. Hierzu ist der XEMA (Xenopus Metamorphosis Assay) entwickelt worden. Das Prinzip dieses Tests beruht auf einer substanzinduzierten Hemmung/bzw. Beschleunigung der Metamorphose des Krallenfrosches. Im Rahmen der OECD Validierung sind Untersuchungen in der sogenannten Phase 1 bereits abgeschlossen, die Phase 2 läuft derzeit. Im Validierungsprozess sind verschiedene Substanzen untersucht worden. Basierend auf diesen Untersuchungen erwartet man, dass *Xenopus* für die Erfassung von Schilddrüseneffekten ein geeignetes Modell mit hoher Spezifität darstellt.

Auf dem letzten VMG-Eco Meeting in 2005 sind Ergebnisse aus vergleichenden Recherchen vorgestellt worden, die sich der Frage widmen, ob die daraus abgeleitete Empfindlichkeit von Amphibien gegenüber Umweltchemikalien, insbesondere gegenüber schilddrüsenaktiven Stoffen, nicht vielleicht schon durch Daten zur akuten und chronischen Fischtoxizität abgedeckt sind (Dorgerloh, 2005). Beim Vergleich wurden akute Daten zur Fischtoxizität gegen akute Daten zur Amphibientoxizität zu 58 getesteten Substanzen aufgetragen (Abbildung 3). Die Linie zeigt, wo bei gleicher Empfindlichkeit von Fischen und Amphibien die Daten liegen müssten. Alle Punkte oberhalb zeigen an, dass der Frosch empfindlicher als der Fisch ist, und umgekehrt. Es ist erkennbar, dass der Fisch bezüglich der akuten Toxizität um den Faktor 10 bis 1000 empfindlicher reagiert.

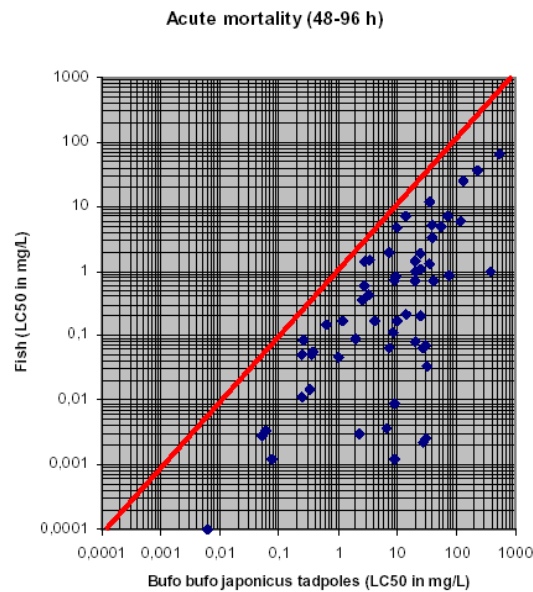


Abbildung 3. Vergleich der akuten Toxizität von Frosch und Fisch [anonymisiert]

An diese Betrachtung schloss sich ein vorläufiger Vergleich zur chronischen Toxizität von Frosch und Fisch an (Abbildung 4).

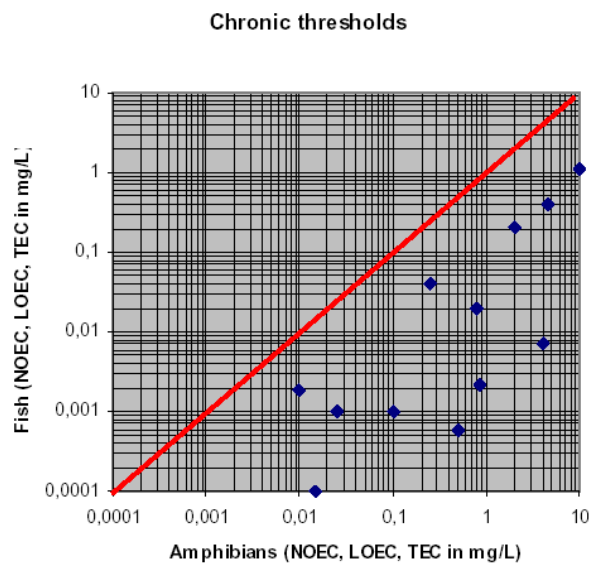


Abbildung 4. Vergleich der chronischen Toxizität von Frosch und Fisch [anonymisiert].

Hier sind auch Tests mit dem Krallenfrosch eingeflossen, die vergleichbar dem XEMA-Protokoll die Frage der möglichen Schilddrüsenwirkung adressieren sollten, beispielsweise Ergebnisse aus „tail resorption“-Tests. Diese Daten wurden gegen Resultate aus ELS – Studien mit dem Fisch aufgetragen, wobei hier nach Möglichkeit bevorzugt die Forelle, aber auch andere Fischarten herangezogen wurden. Auch hier scheinen die Fische um einen Faktor von 10 bis 1000 die empfindlicheren Organismen zu sein.

Diese vorläufige Analyse wirft die Frage auf, ob nicht auch schilddrüsenaktive Substanzen im Interesse des Tierschutzes in einem (möglicherweise erweiterten) ELS am Fisch mit erfasst werden könnten und falls ja, welche zusätzlichen Erkenntnisse der XEMA noch liefern würde. Eine ergebnisoffene Diskussion dieses Punktes ist zu führen.

Validierung von Tests zur Erfassung endokrin vermittelter Schadwirkungen – 3. Invertebraten

Für Invertebraten sind derzeit bei der OECD verschiedene Testsysteme in Diskussion. Von der US EPA wird ein Test mit verschiedenen marinen mysid shrimps wie z.B. *Americamysis bahia* oder *Neomysis integer* vorgeschlagen. Die Testdauer beträgt 47 Tage und umfasst als Endpunkte die Entwicklung sowie die Reproduktion der Tiere. Zu diesem und zu anderen Tests mit aquatischen Arthropoden verfasst die US EPA derzeit ein Detailed Review Paper. Nach einem Vorschlag von Schweden und Dänemark befindet sich momentan ein Life Cycle Test mit marinen Copepoden (*Arcatia tonsa*, *Nitocra spinipes*, *Tisbe battagliai* u.a.) in der Prävalidierungsphase. Die Testdauer beträgt 20 - 25 Tage und umfasst ebenso die Entwicklung und Reproduktion als Endpunkte. Beide Verfahren werden mit Vertretern aus dem marinen Bereich durchgeführt, wichtiger und relevanter für die regulatorische Praxis wären jedoch Testverfahren, die endokrine Effekte auf Süßwasserorganismen aufzeigen.

Japan schlägt die Erweiterung des weltweit etablierten Reproduktionstests mit *Daphnia magna* (OECD Guideline 211) um die Erfassung endokrin vermittelter Endpunkte vor. Hierzu sollen in dem Daphnientest zwei zusätzliche Endpunkte integriert werden (Häutungshäufigkeit und Geschlechterverhältnis der Nachkommenschaft). Eine interessante Alternative bietet auch die Weiterentwicklung der bereits existenten OECD 218 / 219 an der Zuckmücke *Chironomus riparius* zu einem vollständigen Lebenszyklustest, die momentan vom IVA (Industrieverband Agrar) auf Machbarkeit geprüft wird.

Die Zuckmücke *Chironomus riparius* als Vertreter der Insekten steht für die artenreichste Gruppe innerhalb der Invertebraten und durchläuft eine vollständige Metamorphose, während der invertebraten-spezifische hormon-gesteuerte Prozesse von diesen Organismen absolviert werden müssen. Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass Chironomiden sensitiv auf hormon-ähnliche Stoffe reagieren (Trayler et al., 1994). Aufgrund des Entwicklungszyklus der Chironomiden kann in diesem Test die aquatische Phase mit den zwei Umwelt-Kompartimenten Wasser und Sediment abgebildet werden, was eine praxisnahe Risiko-Bewertung ermöglicht. Desweiteren besitzen wir mit der Zuckmücke bereits ein abgestuftes und bewährtes Prüfregime im Rahmen der Pflanzenschutzmittelprüfungen (EU-Richtlinie 912/414/EEC), mit dem die Erfassung sowohl akuter als auch chronischer Effekte aller sensiblen Lebensstadien abgedeckt ist.

Zusammenfassung

Derzeit ist eine Vielzahl von Testverfahren auf dem Gebiet der endokrin vermittelten Schadeffekte in Entwicklung. Die Testentwicklung erfolgt jedoch ohne Priorisierung und ohne Vorgabe einer gezielten Strategie. Es ist jedoch von besonderer Wichtigkeit, eine geringe Anzahl von Testverfahren mit großer Zielgenauigkeit für die Identifikation eines endokrinen Potentials zu entwickeln, um Redundanzen zu vermeiden und den Prüfumfang - und damit die Anzahl der Tierversuche – auf ein notwendiges Maß zu reduzieren. Der vom VCI entwickelte Entscheidungsbaum bietet die Möglichkeit, eine geeignete Prüfstrategie abzuleiten. Eine Voraussetzung für die Festlegung der Prüfungen zu möglicherweise endokrin vermittelten Schadwirkungen stellt die Nutzung aller bereits vorhandenen Information dar. Bei der Testentwicklung wird es als essentiell angesehen, Lücken in der Risikobewertung von möglicherweise endokrin-vermittelten Effekten zu schließen, um treffsicher Effektschwellen für adverse Populationseffekte zu ermitteln. Dies ist die Grundlage für die Nutzung der gewonnenen Erkenntnisse im Rahmen einer Risikobewertung und damit unabdingbare Voraussetzung für den Umgang mit endokrinen Modulatoren in der regulatorischen Praxis.

Literatur

- Dorgerloh, M. (personal communication, 2005)
- Gimeno et al., Poster presentation, SETAC World Congress, November 14-18, 2004, Portland, USA
- OECD 2005, www.oecd.org
- Panter et al., 2004, Poster presentation, SETAC World Congress, November 14-18, 2004, Portland, USA
- Seki, M., Yokota H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K, 2003. Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in Medaka (*Oryzias Latipes*), *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1507-1516
- Pinder, K.M., et al. , 1994, Evaluation of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen (S-31183) against nuisance chironomids (Diptera: Chironomidae), with particular emphasis on *Polypedilum nubifer* (Skuse). *J. Aust. Ent. Soc.* 33 (2), 127-130

Teilnehmerliste

Dr. Bettina **Abbas**
Landesumweltamt Brandenburg
Referat Umweltbeobachtung, Ökotoxikologie
Müllroser Chaussee 50
15236 Frankfurt (Oder)
Telefon: 0335-560-3212
bettina.abbas@lua.brandenburg.de

Annette **Achtabowski**
Schering AG, Werk Bergkamen
Ernst-Schering-Str. 14
59179 Bergkamen
Telefon: 02307-65-2778
annette.achtabowski@schering.de

Petra **Apel**
Umweltbundesamt
Fachgebiet IV I.2
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau
Telefon: 0340-2103-3253
petra.apel@uba.de

Dr. Norbert **Banduhn**
Henkel KGaA
VTF-Human Safety Assessment
Henkelstraße 67
40589 Düsseldorf
Telefon: 0211-797-7344
norbert.banduhn@henkel.com

Prof. Dr. Armin **Basler**
Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und
Reaktorsicherheit
Postfach 12 06 29
53048 Bonn
Telefon: 0228-305 2710
armin.basler@bmu.bund.de

Iris-Constanze **Beck**
GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH
Max-Planck-Str.1
21502 Geesthacht
Telefon: 04152-87 2353
iris.beck@gkss.de

Marie-Perrine **Beck**
Universität Hamburg
Ag. Marine and Freshwater Ecotoxicology
Zeiseweg 9
22765 Hamburg
Telefon: 040-81 96 70 49
Beckmp@uni-hamburg.de

Dr. Rüdiger **Berghahn**
UBA Versuchsfeld Marienfelde
Schichauweg 58
12307 Berlin
Telefon: 030-8903-4132
ruediger.berghahn@uba.de

Dr. Christian **Bögi**
BASF AG
Carl-Bosch-Str. 38
67056 Ludwigshafen
Telefon: 0621-60-59054
christian.boegi@basf-ag.de

Prof. Dr. Thomas **Braunbeck**
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 230
69120 Heidelberg
Telefon: 06221-545668
braunbeck@urz.uni-heidelberg.de

Patricia **Cameron**
Chemiereferat, Bundesgeschäftsstelle des BUND
(Bund für Umwelt und Naturschutz e.V.)
Am Köllnischen Park 1
10179 Berlin
Telefon: 030-27586-426
patricia.cameron@bund.net

Prof. Dr. Ibrahim **Chahoud**
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin/Institut für Klinische
Pharmakologie und Toxikologie, Abt. Toxikologie
Garystr. 5
14195 Berlin
Telefon: 030-8445-1751
ibrahim.chahoud@charite.de

Evelyn **Claus**
Bundesanstalt für Gewässerkunde, Referat G3,
Biochemie/Ökotoxikologie
Am Mainzer Tor 1
56068 Koblenz
Telefon: 0261-13 06 52 81
claus@bafg.de

Ellen **Dhein**
Bayer AG
Governmental & Product Affairs
51368 Leverkusen
Telefon: 0214-30 52571
ellen.dhein.ed@bayer-ag.de

Burkart **Dieterich**
Fachhochschule Bingen/Fraunhofer IME
Berlinstr. 109
55411 Bingen
Telefon: 02972-302-180
burkart.dieterich@ime.fraunhofer.de

Dr. Axel **Dinter**
DuPont de Nemours (Deutschland) GmbH
DuPont Str. 1
61352 Bad Homburg
Telefon: 06172-87 14 44
axel.dinter@deu.dupont.com

Falk Dorusch
Umweltbundesamt
FG IV 2.6
Schichauweg 58
12307 Berlin
Telefon: 030-8903-4165
falk.dorusch@uba.de

Dr. Birte Dreeßen
Sasol Germany GmbH
Paul-Baumann-Str. 1
45764 Marl
Telefon: 02365-49 5039
birte.dreesen@de.sasol.com

Ina Ebert
Umweltbundesamt
FG IV 2.4
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau
Telefon: 0340-2103-3255
ina.ebert@uba.de

Dr. Uwe Ensenbach
Clariant GmbH
EcoToxicology
65840 Sulzbach
Telefon: 06196-757 7302
uwe.ensenbach@clariant.com

Jacqueline Gehrhardt
UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle
GmbH
Permoser Strasse 15
04318 Leipzig
Telefon: 0341-235-2260
jacqueline.gehrhardt@ufz.de

Dr.-Ing. Martin Gehring
Technische Universität Dresden
Institut für Abfallwirtschaft und Altlasten
Pratzschwitzer Str. 15
01796 Pirna
Telefon: 03501-5300-33
martin.gehring@mailbox.tu-dresden.de

Dr. Jens Gercken
Institut für Angewandte Ökologie GmbH
Alte Dorfstraße 11
18184 Neu Broderstorf b. Rostock
Telefon: 03 82 04-6 18 26
gercken@ifaoe.de

Dr.-Ing. Manuel Gottschick
Universität Hamburg
BIOGUM
Ohnhorststr. 18
22609 Hamburg
Telefon: 040-42816 615
gottschick@agchange.de

Dr. Benedikt Graß
quo data GmbH
Siedlerweg 20
01465 Langebrück
Telefon: 035201 70387
berger@quodata.de

Dr. Petra Greiner
Umweltbundesamt
Abteilung IV1
Postfach 1406
06813 Dessau
Telefon: 0340-2103-3002
petra.greiner@uba.de

Dr. Konstanze Grote
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie,
Charité Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Garystr. 5
14195 Berlin
Telefon: 030-8445-1754
konstanze.grote@charite.de

Prof. Dr. Peter-Diedrich Hansen
TU-Berlin
Department of Ecotoxicology, Sekr.OE4
(Oetkerhaus, 4. Stock)
Franklinstrasse 29
10587 Berlin
Telefon: 030-3142-1463 / 01715390474
pd.hansen@tu-berlin.de

Dr. Stefan Hartung
Universitätsklinik Hamburg
Abt. Andrologie / EDEN
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Telefon: 040-42803-1587/83
s.hartung@uke.uni-hamburg.de

Dr. Barbara Heinrich-Hirsch
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
FB Chemikalienbewertung
Thielallee 88-92
14195 Berlin
Telefon: 0188-8412-3384
b.heinrich-hirsch@bfr.bund.de

Sabine Hippe
Klinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
Ernst-Grube-Str.40
06097 Halle
Telefon: 0345-5572318
sabine.hippe@web.de

Rita Hochstrat
RWTH Aachen
Institut für Verfahrenstechnik
Turmstraße 46
52056 Aachen
Telefon: 0241-8 09 05 85
hochstrat@ivt.rwth-aachen.de

Dr. Monika Hofer
SCC GmbH
Mikroforum Ring 1
55234 Wendelsheim
Telefon: 06734-9190
monika.hofer@scc-gmbh.de

Ulrich Irmer
Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau
Telefon: 0340-2103-2312
ulrich.imer@uba.de

Dr. Dirk Jungmann
TU Dresden
Institut für Hydrobiologie, AG Ökotoxikologie
Mommensenstrasse 13
01062 Dresden
Telefon: 0351-4633 23 00
dirk.jungmann@mailbox.tu-dresden.de

Babette Jurkutat
Landesumweltamt Brandenburg
Referat Umweltbeobachtung, Ökotoxikologie
Müllroser Chaussee 50
15236 Frankfurt (Oder)
Telefon: 0335-560 3213
babette.jurkutat@lua.brandenburg.de

Ludwig Karbe
Universität Hamburg
Ag. Marine and Freshwater Ecotoxicology
Zeiseweg 9
22765 Hamburg
Telefon: 04122-88 22
Karbe@uni-hamburg.de

Dr. Harry Keidel
Ministerium für Umwelt und Forsten
Rheinland-Pfalz
Kaiser-Friedrich-Straße 1
51116 Mainz
Telefon: 06131-16-4430
harry.keidel@muf-rip.de

Dirk Keller
Papierfabrik August Koehler AG
Hauptstr. 2
77704 Oberkirch
Telefon: 07802-814625
dirk.keller@koehlerpaper.com

Prof. Dr. Werner Kloas
Leibniz-Institut für Gewässerökologie und
Binnenfischerei
Müggelseedamm 310
12587 Berlin
Telefon: 030-64181-630
werner.kloas@igb-berlin.de

Dr. Thomas Knacker
ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstrasse 2-14
65439 Floersheim am Main
Telefon: 06145-9564 11
th-knacker@ect.de

Dr. Marike Kolossa-Gehring
Umweltbundesamt
FG II 1.2 - Toxikologie, gesundheitsbezogene
Umweltbeobachtung
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Telefon: 030-8903-1600
marike.kolossa@uba.de

Dr. Jens Konradt
Cognis Deutschland GmbH & Co.KG
Henkelstr. 67
40589-Düsseldorf
Telefon: 0211-7940-8773
Jens.Konradt@cognis.com

Dr. Andreas Kortenkamp
University of London
School of Pharmacy
29-39 Brunswick Square
London WC1N 1AX
United Kingdom
Telefon: 0044-20-7753 5908
andreas.kortenkamp@ulsop.ac.uk

PD Dr. Werner Kratz
Landesumweltamt Brandenburg
Referat Umweltbeobachtung, Ökotoxikologie
Müllroser Chaussee 50
15236 Frankfurt (Oder)
Telefon: 0335-560 3213 / 3212
werner.kratz@munr-lua-f-e.brandenburg.de

Manfred Krautter
Greenpeace e.V.
22745 Hamburg
Telefon: 040-306180
manfred.krautter@greenpeace.de

Anke Krey
Institut für Toxikologie und Pharmakologie für
Naturwissenschaftler
Brunswiker Str. 10
24105 Kiel
Telefon: 0431-597 3540
krey@toxi.uni-kiel.de

Sergio Kuriyama
Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut f.
Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung
Toxikologie
Garystr. 5
14195 Berlin
Telefon: 030-8445-1743
sergio.kuriyama@charite.de

Dr. Reinhard Länge
Schering AG
Research Laboratories
Müllerstr. 178
13342 Berlin
Telefon: 030-4681-5328
reinhard.laenge@schering.de

Markus Lehmann
Landesanstalt für Umweltschutz Baden-
Württemberg
Griesbachstr. 1-3
76185 Karlsruhe
Telefon: 0721-983-1574
Markus.Lehmann@lfuka.lfu.bwl.de

Oliver Licht
TU Dresden
BUA Büro Ökotoxikologie
Mommensenstr. 13
01062 Dresden
Telefon: 0351-46 33 64 56
oliver.licht@mailbox.tu-dresden.de

Prof. Walter Lichtensteiger
Universität Zürich
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Entwicklungs- und Umwelttoxikologie
Winterthurerstrasse 190
8057 Zürich
Schweiz
Telefon: +41(0)43-268 9571
walter.lichtensteiger@access.unizh.ch

Dr. Gerd Lindner
Bundesinstitut für Risikobewertung BfR
Thielallee 88-92
14195 Berlin
Telefon: 030-84120
g.lindner@bfr.bund.de

Dr. Norbert Litz
Umweltbundesamt
FG 3.3
Schichauweg 58
12307 Berlin
Telefon: 030-8903-4104
norbert.litz@uba.de

Hanna Maes
RWTH Aachen
Worringerweg 1
52074 Aachen
Telefon: 0241-80 23693
hanna.maes@bio5.rwth-aachen.de

Dr. Kirsten Märkel
Umweltbundesamt
FG II 1.2 - Toxikologie, gesundheitsbezogene
Umweltbeobachtung
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Telefon: 030-8903-1344
kirsten.maerkel@uba.de

Ursula Mathar
Bayer AG
Governmental & Product Affairs
51368 Leverkusen
Telefon: 0214-30 36520
ursula.mathar.um@bayer-ag.de

Wiebke Meyer
Universität Bremen
Leobener Straße
28359 Bremen
Telefon: 0421-218-4289
wimeyer@uni-bremen.de

Dr. Hanny Nover
Ministerium für Umwelt und Naturschutz,
Landwirtschaft und Verbraucherschutz NRW
Schwannstr. 3
40476 Düsseldorf
Telefon: 0211-4566-275
nover@munlv.nrw.de

Prof. Dr. Jörg Oehlmann
J. W. Goethe-Universität Frankfurt
Zoologisches Institut
Siesmayerstrasse 70
60054 Frankfurt/M
Telefon: 069-798 24738
oehlmann@zoology.uni-frankfurt.de

Dr. Dirk Pallapies
BASF AG
Arbeitsmedizin und Gesundheitsschutz
GOA/CP-H308
67056 Ludwigshafen
Telefon: 0621-60-93860
dirk.pallapies@basf-ag.de

Thomas Preuß
RWTH Aachen
Worringerweg 1
52074 Aachen
Telefon: 0241-80 2 36 93
thomas@bio5.rwth-aachen.de

Dr. Kristin Radke
BASF AG
GUP/CB, Z470
Carl-Bosch-Str. 38
67056 Ludwigshafen
Telefon: 0621-60-5 83 86
kristin.radke@basf-ag.de

Marianne Rappolder
Umweltbundesamt
FG IV 2.4 Umweltbewertung
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau
Telefon: 0340-2103-3191
marianne.rappolder@uba.de

Dr. Hans Toni Ratte
RWTH Aachen
Worringerweg 1
52074 Aachen
Telefon: 0241-80 26 680
toni.ratte@bio5.rwth-aachen.de

Dr. Bettina **Rechenberg**
Umweltbundesamt
Fachgebiet II 3.4
Qualität von Oberflächengewässern
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau
Telefon: 0340-2103-2785
bettina.rechenberg@uba.de

Dr. Georg **Reifferscheid**
Bundesanstalt für Gewässerkunde
Am Mainzer Tor 1
56068 Koblenz
Telefon: 0261-1306 5176
reifferscheid@bafg.de

Anna **Reye**
Universität Tübingen
Konrad-Adenauer-Str. 20
72072 Tübingen
Telefon: 07071-7 57 35 57
Anna.Reye@web.de

Markus **Salomon**
Sachverständigenrat für Umweltfragen
Reichpietschufer 60
10785 Berlin
Telefon: 030-263 69 61 25
markus.salomon@uba.de

Dr. Andrea **Salzbrunn**
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Andrologische Abteilung
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Telefon: 040-42803 3640
salzbrunn@uke.uni-hamburg.de

Dr. Christoph **Schäfers**
Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie
Postfach 12 60
57377 Schmallenberg
Telefon: 0 29 72-302-270
christoph.schaefers@ime.fraunhofer.de

Prof. Dr. Andreas **Schäffer**
RWTH Aachen; Fraunhofer IME
Worringerweg 1
52074 Aachen
Telefon: 0241-80 2 68 15
andreas.schaeffer@ime.fraunhofer.de

Dr. Clemens **Schanne**
SpringbornSmithers Laboratories (Europe) AG
Seestrasse 21
9326 Horn
SCHWEIZ
Telefon: 0041(0)71-844 69 70 / 71 846 89 44
cschanne@springbornsmithers.ch

Martin **Schirling**
Universität Tübingen
Konrad-Adenauer-Straße 20
72072 Tübingen
Telefon: 07071-7 57 35 57
martin.schirling@uni-tuebingen.de

PD Dr. Cornelia **Schmutzler**
Institut für Experimentelle Endokrinologie
Molekulare Endokrinologie
Humboldt Universität Berlin, Charité I
Schumannstraße 20-21
10098 BERLIN
Telefon: 030-450 52 40 21
cornelia.schmutzler@charite.de.

Dr. Christoph **Schulte**
Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau
Telefon: 0340-2103 3162
christoph.schulte@uba.de

Dr. Ulrike **Schulte-Oehlmann**
J. W. Goethe-Universität Frankfurt
Zoologisches Institut
Siesmayerstrasse 70
60054 Frankfurt/M
Telefon: 069-798 24850
schulte-oehlmann@zoology.uni-frankfurt.de

Dr. Hasso **Seibert**
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Institut für Toxikologie und Pharmakologie für
Naturwissenschaftler
Brunswiker Str. 10
24105 Kiel
Telefon: 0431-597 3558
seibert@toxi.uni-kiel.de

Dr. Ewald **Seliger**
Klinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
Ernst-Grube-Str.40
06097 Halle
Telefon: 0345-5 57 25 20
ewald.seliger@medizin.uni-halle.de

Dorothea **Selke**
Landesumweltamt NRW
Auf dem Draap 25
40221 Düsseldorf
Telefon: 0211-1590-2378 / 0162-9244181
dorothea.selke@lua.nrw.de

Dr. Rainer **Sodtke**
Universität Hamburg
FSP Biotechnik, Gesellschaft und Umwelt
Ohnhorststr. 18
22609 Hamburg
Telefon: 040-42816-614
sodtke@agchange.de

Prof. Dr. Holmer **Sordyl**
Institut für Angewandte Ökologie GmbH
Alte Dorfstraße 11
18184 Neu Broderstorf
Telefon: 038204-618 24
sordyl@ifaoe.de

Dr. Burkhard **Stachel**
Freie und Hansestadt Hamburg
Behörde für Stadtentwicklung und Umwelt,
Gewässerschutz - U11
Billstraße 84
20539 Hamburg
Telefon: 040-42845-2245
burkhard.stachel@bsu.hamburg.de

Dr. Klaus Günther **Steinhäuser**
Umweltbundesamt
Leiter FB IV - Chemikalien- und
biologische Sicherheit
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau
Telefon: 0340-2103-3000
klaus-g.steinhaeuser@uba.de

Dr. Hans-Christian **Stolzenberg**
Umweltbundesamt
FG IV 2.4 - Ökotoxikologische Bewertung von
Stoffen
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau
Telefon: 0340-2103-3113
hans-christian.stolzenberg@uba.de

Kathrin **Stricker**
Thüringer Landesanstalt für Umwelt und Geologie
Prüssingstr. 25
07745 Jena
Telefon: 03641-684509
K.Stricker@TLUGJena.Thueringen.de

Dr. Klaus **Stroech**
LANXESS Deutschland GmbH
Geb. G 19
51369 Leverkusen
Telefon: 0214-30-62268
klaus.stroech@lanxess.com

Dr. Gisela **Stropp**
Bayer AG
Industrial Toxicology
Aprather Weg
42096 Wuppertal
Telefon: 0202-368 198
gisela.stropp@bayerhealthcare.com

Dr. Chris **Talsness**
Charité Universitätsmedizin Berlin
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie,
Abteilung Toxikologie
Garystr. 5
14195 Berlin
Telefon: 030-8445 1754
chris.talsness@charite.de

Matthias **Teigeler**
RWTH Aachen
c/o Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie
Postfach 12 60
57377 Schmallenberg
Telefon: 0 29 72-302-152
matthias.teigeler@ime.fraunhofer.de

Dr. Anette **Thiel**
SCC GmbH
Mikroforum Ring 1
55234 Wendelsheim
Telefon: 06734-9190
anette.thiel@scc-gmbh.de

Ralph **Urbatzka**
Leibniz-Institut für Gewässerökologie und
Binnenfischerei
Müggelseedamm 301
12587 Berlin
Telefon: 030-64181-614
ralph.urbatzka@igb-berlin.de

Christoph **van Ballegooy**
Leibniz-Institut für Gewässerökologie und
Binnenfischerei
Müggelseedamm 310
12587 Berlin
Telefon: 030-64181-637
vanballegooy@igb-berlin.de

Dr. Richard **Vogel**
Bundesinstitut für Risikobewertung, ZEBET
Diedersdorfer Weg 1
12277 Berlin
Telefon: 01888-412-3297
r.vogel@bfr.bund.de

Dr. K. Theo **von der Trenck**
Landesanstalt für Umweltschutz Baden-
Württemberg
Abt. 2
Referat 23 - Biologische Umweltbeobachtung
Postfach 21 07 52
76157 Karlsruhe
Telefon: 07 21/9 83-13 17
Theo.v.d.Trenck@lfuka.lfu.bwl.de

Dr. Burkard **Watermann**
LimnoMar
Bei der Neuen Münze 11
22145 Hamburg
Telefon: 040-6789911
watermann@limnomar.de

Dr. Andrea **Wenzel**
Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie
Postfach 12 60
57377 Schmallenberg
Telefon: 0 29 72-302-329
andrea.wenzel@ime.fraunhofer.de

Ulrike Weyand

Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI)
Karlstraße 21
60329 Frankfurt am Main
Telefon: 069-2556-1461
Weyand@VCI.de

Dr. Arndt Weyers

Bayer Industry Services
Geb. Q 18
51368 Leverkusen
Telefon: 0214-30-33303
arnd.weyers.aw@bayerindustry.de

Cornelia Willing

Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
Klinik f. Geburtshilfe u. Reproduktionsmedizin
Ernst-Grube-Str.40
06120 Halle
Telefon: 0345-557 5264
ConnyWilling@web.de

Dr. Detlef Wölfle

Bundesinstitut für Risikobewertung
Thielallee 88-92
14195 Berlin
Telefon: 01888-412 3419
d.woelfle@bfr.bund.de

Dr. Leah Wollenberger

Technical University of Denmark
Bygningstorvet 115
2800 Lyngby
Denmark
Telefon: +45-45251600
lew@er.dtu.dk

Carolin Zerger

Chemiereferat, Bundesgeschäftsstelle des BUND
(Bund für Umwelt und Naturschutz e.V.)
Am Köllnischen Park 1
10179 Berlin
Telefon: 030-27586-0
carolin.zerger@bund.net

3. Statusseminar

Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System

Das Umweltbundesamt veranstaltete am 2. Juni 2005 in Berlin das 3. Statusseminar „Umwelthormone – Wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung und Regulierung“, an dem etwa 100 Teilnehmerinnen und Teilnehmer aus Behörden, Forschungseinrichtungen, Nichtregierungsorganisationen und aus der Industrie teilnahmen.

Ziel des Seminars war die Definition von Schritten, die für endokrin wirksame Chemikalien zur Entwicklung von Prüf- und Bewertungsstrategien auf der Basis wissenschaftlicher Erkenntnisse erforderlich sind. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf das neue europäische Chemikalienmanagement REACH, das für besonders gefährliche Stoffe ein Zulassungsverfahren vorsieht. Die endokrine Wirksamkeit einer Chemikalie steht als eines der besonderen Gefährdungsmerkmale zur Diskussion, die ein Zulassungsverfahren auslösen würden.

Die Themen des Seminars waren so gewählt, dass ein wissenschaftlicher Austausch zwischen Forschung und Regulierung stattfand und dadurch die Sichtweise des jeweils anderen Bereichs verdeutlicht wurde. Neueste Erkenntnisse und Problemanalysen zu Auswirkungen auf Umweltorganismen und auf die menschliche Gesundheit wurden vorgestellt, und die Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen aus der Forschung und von Regierungsbehörden diskutierten gemeinsam das weitere Vorgehen.