

UMWELT & GESUNDHEIT

11/2015

Beobachtung der gesundheitlichen Entwicklung von Kindern und Müttern nach hoher Belastung mit PFOA – Arnsberg Kohorte

Kurzfassung

UMWELT & GESUNDHEIT 11/2015

Umweltforschungsplan des
Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit

Forschungskennzahl 3710 61 22 2
UBA-FB 002038

Beobachtung der gesundheitlichen Entwicklung von Kindern und Müttern nach hoher Belastung mit PFOA – Arnsberg Kohorte

von

M. Joswig, N. Goeken, U. Mogwitz, S. Schaub, M. Wilhelm, J. Hölzer
Ruhr-Universität Bochum, Bochum

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber:

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
info@umweltbundesamt.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt

Durchführung der Studie:

Abteilung für Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin, Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150
44801 Bochum

Abschlussdatum:

August 2014

Redaktion:

Fachgebiet II 1.1 Toxikologie, Gesundheitsbezogene
Umweltbeobachtung
Ulrike Fiddicke

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/beobachtung-der-gesundheitlichen-entwicklung-von>

ISSN 1862-4340

Dessau-Roßlau, November 2015

Das diesem Bericht zu Grunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit unter der Forschungskennzahl 3710 61 222 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

2006 wurden erhöhte Konzentrationen perfluorierter Verbindungen (per- and polyfluorinated alkyl substances; PFAS) im Trinkwasser von Wasserwerken des Hochsauerlandkreises festgestellt. Hauptkomponente in Anteilen von 50 - 80 % war die Perfluorooctansäure (perfluorooctanoic acid; PFOA). Im Trinkwasser aus Wasserwerken, die Rohwasser aus Ruhr und Möhne entnahmen, fanden sich bis zu 0,52 µg PFOA/l [Skutlarek et al. 2006]. Es stellte sich heraus, dass diese Kontamination durch das Aufbringen von Industrieabfall auf landwirtschaftliche Flächen verursacht worden war. Die Abteilung für Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin der Ruhr-Universität Bochum (RUB) konzipierte daraufhin im Auftrag des Landes NRW eine prospektive Querschnittstudie und untersuchte im Jahr 2006 in der Region Arnsberg die Plasma-Konzentrationen perfluorierter Verbindungen in verschiedenen Kollektiven, darunter auch bei 5 bis 6-jährigen Kindern und ihren Müttern (insgesamt 90 Mutter-Kind-Paare). Sämtliche untersuchte Mutter-Kind-Paare waren nach Einschätzung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) zwischen 2004 und Mai 2006 erhöhten PFOA-Konzentrationen über das Trinkwasser ausgesetzt [LANUV 2011]. Die Konzentrationen im Blutplasma waren 2006 etwa 4 bis 8-fach höher als in unbelasteten Vergleichskollektiven [Hölzer et al. 2008]. Dasselbe Kollektiv, zu dem neben den Mutter-Kind-Paaren auch weitere ca. 70 Mütter und 100 Männer Arnsbergs gehörten, wurde von der Abteilung für Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin der RUB in den Jahren 2007, 2008 und 2010 wiederholt untersucht. Schwerpunkt dieser Follow-up-Studien war die Beobachtung des Rückgangs der inneren Belastung gegenüber PFOA. Die Trinkwasserbelastung wurde im Wesentlichen durch Aktivkohlefilterung (seit Juli 2006) sowie die Verminderung des weiteren Eintrags in Oberflächengewässer deutlich, zeitweilig unter die analytische Nachweisgrenze, gesenkt.

Die erhöhte, inzwischen langsam rückläufige innere Belastung der ca. 40.000 Arnsberger Bürger mit PFOA erfordert aus Gründen des vorbeugenden Gesundheitsschutzes eine weitere Beobachtung. Weil die chronischen Wirkungen perfluorierter Verbindungen Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion sind, sollen Hinweise aus der aktuellen Literatur aufgegriffen und die Pubertätsentwicklung Arnsberger Kinder überprüft werden.

1.2 Hinweise auf Entwicklungstoxizität perfluorierter Verbindungen

Aktuell wurde eine ausführliche Literaturzusammenstellung tierexperimenteller und humaner Beobachtungsstudien von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit publiziert [EFSA 2014]. Teratogene Wirkungen von PFOS wurden meist erst bei maternotoxischen Dosen beobachtet. Dagegen bewirkte die Verabreichung von PFOS an trächtige Tiere dosisabhängig deutliche Schäden bei den Nachkommen. Es scheint, dass die pränatale Exposition von entscheidender Bedeutung ist. Morbidität und Mortalität der Nachkommen waren mit der Körperlast gegenüber PFOS (Leber- und Serumgehalte) assoziiert. Bei Ratten und Mäusen waren die Wirkungen nahezu identisch. Auch bei anderen Spezies (Hühner, Wachteln) wurden entwicklungstoxische Effekte durch PFOS beobachtet. Überlebende Nachkommen wiesen nach pränataler Exposition Entwicklungsdefizite (z.B. verzögerte Gewichtszunahme, neurologische Defizite) auf.

Zur Entwicklungstoxizität perfluorierter Verbindungen beim Menschen gibt es bisher nur wenige Studien. Fei et al. [2007, 2008] fanden eine negative Assoziation zwischen PFOA-Gehalten in mütterlichem Plasma (Exposition im Bereich der Hintergrundbelastung) und dem Geburtsgewicht. Apelberg et al. [2007a; 2007b] beobachteten eine negative Assoziation zwischen den PFOS- und PFOA-Gehalten im Nabelschnurblut und Geburtsgewicht und Körpergröße. Die Effekte waren allerdings schwach ausgeprägt. In einer Untersuchung eines über das Trinkwasser exponierten Kollektives aus Little Hocking, USA, konnte keine Assoziation erhöhter PFOA-Konzentrationen mit erniedrigtem Geburtsgewicht festgestellt werden [Nolan et al. 2009].

Es werden für perfluorierte Verbindungen im Tierversuch Suppressionen der Schilddrüsenhormone beschrieben [Lau et al. 2007]. Auch wurden Interaktionen mit den Sexualhormonen festgestellt, die sich, je nach Art der Verbindung, unterschiedlich ausprägen [Jensen und Leffers 2008]. In mehreren Studien wurde übereinstimmend nach Gabe von PFOA an männliche Ratten eine Abnahme der Testosteron- und ein Anstieg der Estradiolgehalte im Serum festgestellt [Lau et al. 2007]. Ferner wurde bei chronisch PFOA-exponierten Ratten die Beeinflussung der Sexualhormonspiegel mit der Induktion von Leydigzelladenomen in Verbindung gebracht. In allen bisher bekannten Humanstudien wurden auch bei hochbelasteten Arbeitern keine derartigen Assoziationen zwischen der Belastung gegenüber perfluorierten Verbindungen und Einflüssen auf den Schilddrüsenhormon- und Sexualhormonstatus beobachtet. Allerdings wurde in Humanstudien bei hoch PFOA-exponierten Arbeitern ein Anstieg des Vorläufers des Testosterons, 17-alpha Hydroxyprogesteron (17-OHP), mit steigendem PFOA beschrieben [Olsen et al. 1998]. In Subgruppen wurde eine signifikante Assoziation zu den TSH-Konzentrationen

festgestellt. Olsen et al. [2003] fanden Hinweise darauf, dass die T3-Serumkonzentration mit der PFOS- und PFOA-Belastung steigt. Insgesamt scheinen die Ergebnisse aus dem Tiermodell nicht in Einklang mit den Humandaten zu stehen. Eine durch perfluorierte Verbindungen bedingte Modulation der Schilddrüsenhormone bei hoher Belastung scheint aber möglich zu sein.

Eine Veröffentlichung des C8-Science Panels berichtet von einer durchschnittlichen Verzögerung des Pubertätseintritts bei Mädchen um 130 Tage in der am höchsten PFOA-belasteten Gruppe im Vergleich zur am niedrigsten belasteten Gruppe des Studienkollektives¹ [Lopez-Espinosa et al. 2011].

1.3 Ziel

Bei Mutter-Kind-Paaren aus dem über das Trinkwasser mit PFOA belasteten Arnsberger Kollektiv sollen mögliche gesundheitliche Wirkungen perfluorierter Verbindungen auf die kindliche Gesundheit, hier insbesondere die Pubertätsentwicklung, untersucht werden.

2 Methoden und Untersuchungsinstrumente

2.1 Gesundheitsfragebogen

Die Probandinnen und Probanden erhielten im Jahr 2012 und 2013 jeweils einen Fragebogen zum Selbstausfüllen (Gesundheitsfragebogen) per Post. Neben Größe und Gewicht wurden darin Angaben zur Exposition gegenüber Tabakrauch, zu etwaigen Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen des Kindes erfragt.

2.2 Pubertal Development Scale-Fragebogen

Die Erfassung der Pubertätsentwicklung erfolgte mittels des PDS (Pubertal Development Scale)-Fragebogens [Petersen et al. 1988; Carskadon und Acebo 1993; Watzlawik 2009]. Dieses Instrument ermöglicht, pubertäre Entwicklungsstadien bei Jungen und Mädchen anhand verschiedener anamnestisch erfragter Kriterien zu differenzieren. Es handelt sich hierbei um die Einschätzung eines Elternteils (Mutter) bzgl. der Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale.

Es werden fünf Pubertätsstadien erfasst: Vorpubertät (Stadium I), beginnende Pubertät (Stadium II), mitten in der Pubertät (Stadium III), fortgeschrittene Pubertät (Stadium IV) und Postpubertät (Stadium V). Gemäß Watzlawik [2009], wird für jede Antwortoption, ein Punktwert vergeben. Die Angabe zur Menarche fließt nicht als

¹http://www.c8sciencepanel.org/pdfs/Status_Report_C8_and_puberty_27Sept2010.pdf

Zahlenwert in die Berechnung ein, sondern wird als Zusatzkriterium betrachtet. Es werden Punktskizzen aus 2 (♀; Achsel-/Schambehaarung und Brustwachstum [+ Zusatzkriterium Menarche]) bzw. 3 Fragen (♂ ; Achsel-/Schambehaarung, Bartwachstum, Stimmbruch) berechnet. Wie von Chan et al. [2010] beschrieben, werden die Punktwerte addiert und einem Pubertätsstadium zugeordnet.

2.3 PFAS-Human-Biomonitoring, Sexualhormone und klinisch-chemische/hämatologische Messgrößen

Die Analysen der perfluorierten Verbindungen wurden durch das Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Universität Erlangen durchgeführt. Die Methode basiert auf einer Festphasenextraktion, anschließender flüssigkeitschromatographischer Trennung und tandem-massenspektrometrischer Detektion.

Die Bestimmung der Sexualhormone erfolgte im Hormonlabor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen mittels Radio-, Chemilumineszenz- und kompetitiven Enzymimmunoassays.

Die übrigen klinisch-chemischen und hämatologischen Messgrößen wurden im Institut für Klinische Chemie, Transfusions- und Laboratoriumsmedizin der Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinik Bergmannsheil, Bochum, mit den dort etablierten Methoden bestimmt.

2.4 Anthropometrische Messung

Die Kinder wurden anlässlich der Untersuchung im Jahr 2012 gewogen. Außerdem wurden Körpergröße, Taillen- und Hüftumfang gemessen. Körpergewicht und -größe wurden 2013 erneut mittels Fragebogen erhoben. Auf Grundlage der Untersuchung bzw. Fragebögen wurde der Body-Mass-Index berechnet (Gewicht [kg]/Größe [m]²).

Die Bestimmung des Körperfettanteils erfolgte mittels Calipometrie (Hautfaltendickemessung) und anschließender Berechnung nach Siri [1956] und Brook [1971].

Es erfolgten 81 Körperfalten- und anthropometrische Messungen (Körpergröße und -gewicht).

2.5 Datenauswertung/Statistik

Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen wurden mit geeigneten Verfahren (z.B. t-test der logarithmierten Daten oder Wilcoxon-Rangsummentest) geprüft. Ein möglicher monotoner bzw. linearer Zusammenhang zwischen Pubertätsindikatoren,

Confoundern und PFAS-Konzentrationen wurde mittels des Spearman-Korrelationskoeffizienten bzw. des Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten überprüft.

Der Einfluss der Blutkonzentrationen perfluorierter Verbindungen auf die Zielgrößen (Hormonkonzentrationen, klinisch-chemische Messgrößen) wurde mit multivariaten Verfahren (multiple lineare Regression und logistische Regression) unter Berücksichtigung möglicher Confounder analysiert. Darüber hinaus wurden das lineare Modell sowie das logistische Modell genutzt, um die longitudinal erhobenen Messgrößen in GEE (Generalized Estimating Equations)-Modellen zu analysieren. Die PDS-Stadien wurden mithilfe einer ordinalen Regression modelliert.

Die Datenauswertung erfolgte mit SAS Version 9.3 (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina 27513, USA).

2.6 Blutentnahme und Interview am Untersuchungstag 2012

Im Zeitraum vom 8. Oktober bis zum 23. November 2012 wurden 81 Mutter-Kind-Paare in den Räumlichkeiten des Arnsberger Gesundheitsamtes untersucht. Es erfolgten 76 Blutentnahmen bei Kindern und 81 bei Müttern.

In den Blutproben der Mütter und Kinder wurden die Gehalte der perfluorierten Verbindungen PFOA, PFOS, PFHxS, PFBS, PFPA, PFNA und PFHxA bestimmt. In den Blutproben der Kinder wurde zusätzlich analysiert:

- Kleines- und Differential-Blutbild
- Gesamt- und LDL-, HDL-Cholesterin, GOT, GPT, γ GT, CRP
- Schilddrüsenhormone T3, T4, FT3, FT4, TSH
- Sexualhormone Testosteron, Estradiol, Hormonvorstufen DHEA-S und 17-OHP

Die Blutproben wurden nach der Entnahme bei 4-8°C gekühlt und am gleichen Tag weiterbearbeitet.

Der Trinkwasserkonsum und das Ernährungsverhalten von Mutter und Kind sowie Angaben zu Schwangerschaften und Schwangerschaftskomplikationen (seit 2003) wurden, ebenso wie der Sozialstatus, durch trainierte Interviewer bei 81 Mutter-Kind-Paaren erhoben.

3 Ergebnisse

3.1 Teilnahme

Die Studie wurde in drei Phasen von 2011 bis 2013 durchgeführt. Es wurden sämtliche Mutter-Kind-Paare der Geburtsjahrgänge 2000 und 2001 eingeladen, die im Herbst 2006 in einem der Arnsberger Stadtteile Holzen, Bruchhausen, Neheim, Hüsten oder Herdringen lebten und an der Einschulungsuntersuchung teilgenommen hatten. Insgesamt sagten 99 Mutter-Kind-Paare ihre Teilnahme an der Studie von 2011 bis 2014 zu.

Jährlich im Herbst von 2011 bis 2013 wurde eine Befragung der Eltern der Kinder zum Stand der sexuellen Entwicklung mittels des PDS-Fragebogens durchgeführt.

Von 76 Kindern und 81 Müttern konnten Blutproben zur Bestimmung der PFAS-Konzentrationen entnommen werden.

3.2 Stand der sexuellen Entwicklung

Zum Erhebungszeitpunkt 2011 zeigten 77 % der Jungen noch keine Anzeichen der Veränderung des Bartwuchses, der Stimme, und der Achsel- und Schambehaarung. Diese Jungen waren demnach im Stadium I der Pubertätsentwicklung (Vorpubertät, Kriterien des PDS-Scores nach Watzlawik [2009]). 23 % der Jungen hatten wenigstens das Pubertätsstadium II (beginnende Pubertät) erreicht. Die Jungen waren zwischen 10,4 und 11,9 Jahre alt (Median: 11,1 Jahre).

2012 war noch ca. die Hälfte aller Jungen im Pubertätsstadium I. Im Jahr 2013 hat sich das Verhältnis zu 2011 umgekehrt: Nur noch 23 % der Jungen waren im Pubertätsstadium I, 28 % waren in Stadium II, 40 % in Stadium III (mitten in der Pubertät) und 9 % in Stadium IV (fortgeschrittene Pubertät). Keiner hatte zu diesem Zeitpunkt Stadium V (Postpubertät) erreicht. Das Alter lag zu diesem Zeitpunkt zwischen 12,3 und 13,8 Jahren (Median 13,0 Jahre). Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die Anteile der Jungen und Mädchen in den Pubertätsstadien zwischen 2011 und 2013.

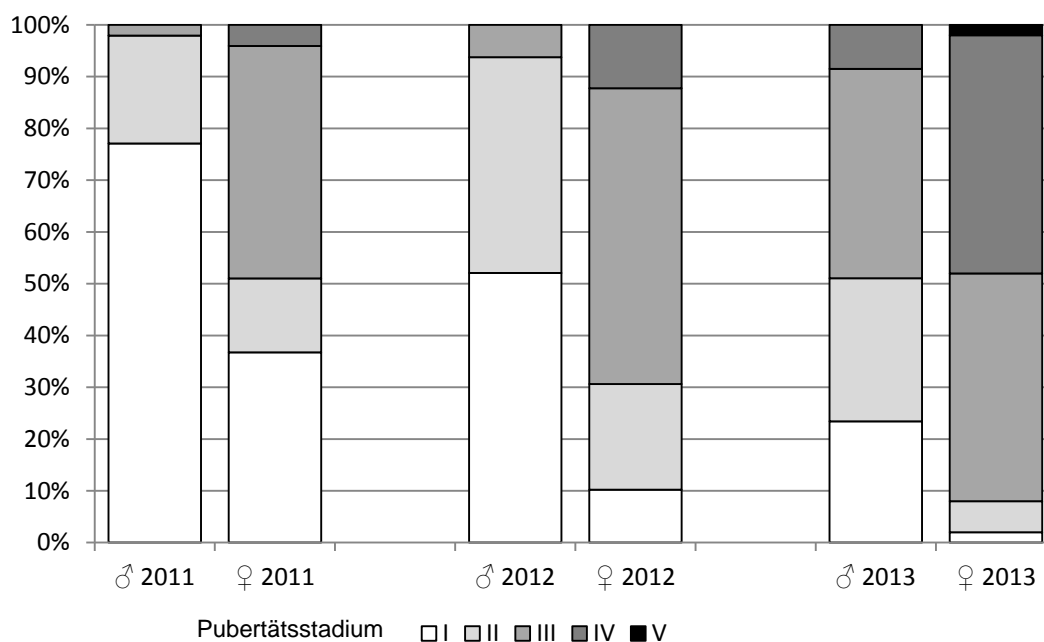


Abbildung 1: Pubertätsstadien 2011-2013 nach PDS-Fragebogen bei 48 Jungen und 50 Mädchen.

2011 wurden bei 37 % der Mädchen von den Müttern noch kein beginnendes Wachstum der Brust und der Achsel- und Schambehaarung beobachtet, auch die Menarche war noch nicht eingetreten (Stadium I). 14 % hatten Stadium II, 45 % Stadium III erreicht. Bei 4 % der Mädchen war 2011 die Menarche berichtet worden (Stadium IV). Die Mädchen waren zwischen 10,4 und 11,9 Jahren alt (Median 11,1 Jahre).

2012 waren 10 % der Mädchen im Pubertätsstadium I, 2013 nur noch eines (2%). Im Jahr 2013 hatten 46 % der Mädchen Pubertätsstadium IV, und 44 % Stadium III erreicht. Die Mädchen waren zu diesem Zeitpunkt zwischen 12,4 und 13,5 Jahren alt (Median 12,9 Jahre).

3.3 Konzentrationen der Hormone, Sexualhormone, der Hormonvorstufen und der klinisch-chemischen Messgrößen

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Konzentrationen der Sexualhormone und der Hormonvorstufen, der Schilddrüsenhormone und des Cholesterins.

Tabelle 1: Schilddrüsen- und Sexualhormone, Cholesterin-Konzentrationen der Kinder im Vergleich zu Referenzbereichen.

		N	MWgeom	Min	Max	Referenzbereich	N>Ref	N<Ref	Lit.
Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	♂	33	173,5	96	237	<220	3		[Thomas 2005]
	♀	41	174,9	96	231	<220	3		

		N	MWgeom	Min	Max	Referenzbereich	N>Ref	N<Ref	Lit.
LDL-Cholesterin [mg/dl]	♂	33	88,2	46	144	<130	3		[van Helden et al. 2011]
	♀	41	90,5	40	158	<130	3		
HDL-Cholesterin [mg/dl]	♂	33	54,5	29	99	>35		1	
	♀	41	58,7	35	97	>35			
TT3 [µg/l]	♂	33	1,5	1,2	2	0,8-2,1			
	♀	41	1,5	1,1	2	0,8-2,1			
TT4 [µg/l]	♂	33	79,7	62	108	49-107			
	♀	41	76,7	61	104	49-107			
FT3 [pmol/l]	♂	33	5,8	4,7	11,1	4,6-7,1	2		
	♀	41	5,8	3,9	8,3	4,1-7,2	7	1	
FT4 [ng/l]	♂	33	7,6	6	10	7-12		5	
	♀	41	7,1	5	10	7-12		12	
TSH [mIU/l]	♂	33	2,1	1	7,4	1,1-5,3	1	1	
	♀	41	1,8	0,77	4,7	1,1-5,3	1	5	
DHEAS [ng/ml]	♂	33	1367	454	2822	118-3732			[Elmlinger et al. 2005]
	♀	43	879	264	2108	247-2255			
Estradiol [pg/ml]	♂	33	<BG	<BG	9,7	7,1-481		27	
	♀	43	10,3	<BG	240	<BG-60,2	1	7	
Testosteron [ng/dl]	♂	33	14,2	<BG	247	3-161	1	9	[Kulle et al. 2010]
	♀	43	5,9	<BG	27	3-43		12	
17-OHP	♂	33	38,4	15	92	<160			Binder*
	♀	43	38,2	8,2	113	<160			

*[Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen 2014]

3.4 Innere Belastung der Mütter und Kinder mit perfluorierten Verbindungen

Bei 76 Kindern und 81 Müttern konnten die PFOA-Konzentrationen bestimmt werden, der geometrische Mittelwert betrug 5,1 µg/l bei den Kindern und 5,2 µg/l bei den Müttern. Im Vergleich zu den Kindern wurden im Kollektiv der Mütter höhere maximale PFOA-Konzentrationen im Blutplasma bestimmt (Abbildung 2). 10 % der Konzentrationen lagen oberhalb des Referenzwertes der HBM-Kommission, dies betraf 14 Mütter und 1 Kind.

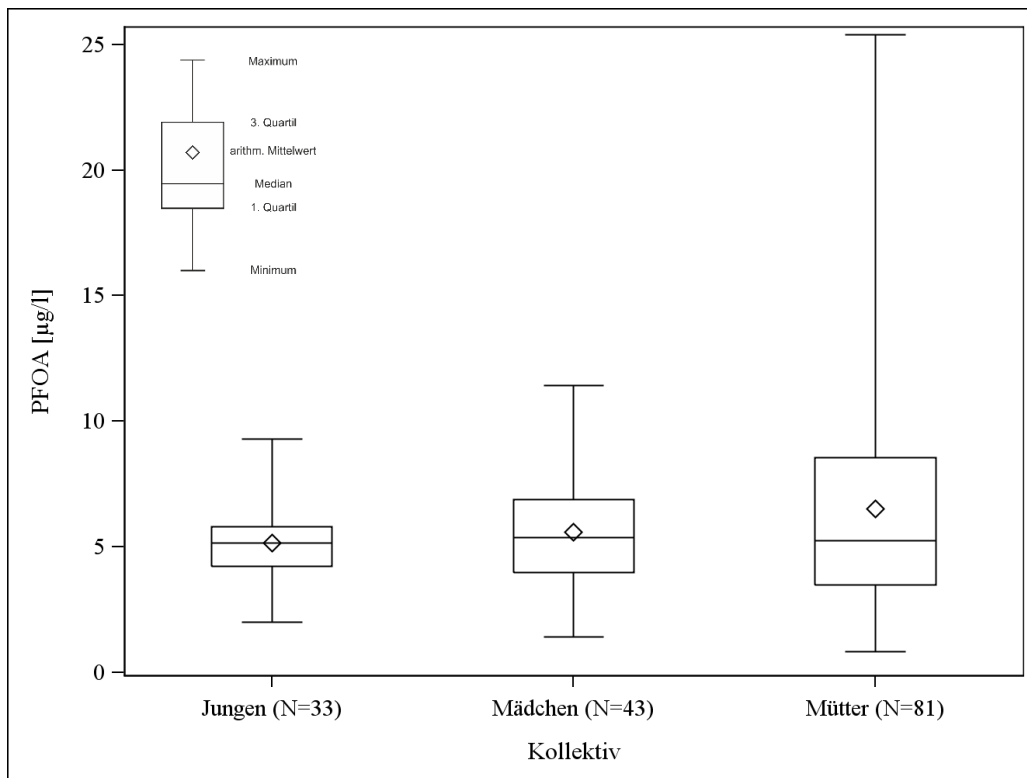


Abbildung 2: PFOA-Konzentrationen der Jungen, Mädchen und Mütter im Jahr 2012.

Im geometrischen Mittel liegen die PFOS-Plasmakonzentrationen bei 3,0 µg/l (Mütter) und 2,8 µg/l (Kinder). Die höchste Konzentration bei Kindern beträgt 10,2 µg/l. Die PFOA- und PFOS-Konzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Jungen und Mädchen.

Im Gesamtkollektiv wurden PFHxS-Konzentrationen von 0,2 µg/l bis 3,6 µg/l bestimmt. Das geometrische Mittel lag dabei bei den Kindern bei 0,7 µg/l und bei den Müttern bei 0,6 µg/l. Mädchen weisen etwas höhere Konzentration als Jungen auf, der Unterschied ist jedoch nur schwach signifikant ($P = 0,08$).

PFBS war in 10 % aller untersuchten Serumproben nachweisbar. Die höchste bestimmte Konzentration im Gesamtkollektiv lag bei 0,2 µg/l.

In 93 % der Proben lag die PFNA-Konzentration oberhalb der Bestimmungsgrenze (0,3 µg/l). Die höchste Konzentration wurde bei einer Mutter gemessen (3,4 µg/l), zwischen Jungen und Mädchen wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Die perfluorierten Verbindungen PFPA und PFHxA wurden in keiner der untersuchten Blutproben nachgewiesen.

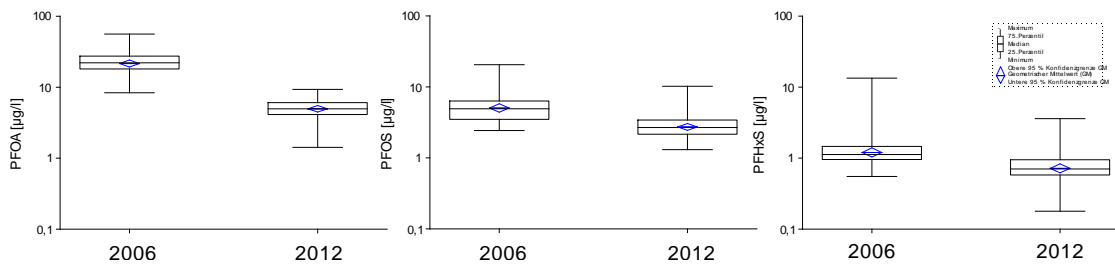


Abbildung 3: PFOA-, PFOS- und PFHxS-Konzentrationen bei Kindern. Vergleich zwischen 2006 und 2012. Logarithmische Skalierung.

3.5 Assoziation zwischen PFOA/PFOS mit Stoffwechselfmessgrößen und Gamma-Glutamyltransferase

In GEE-Modellen wurden statistisch signifikante Assoziationen zwischen den Gesamt-Cholesterin-Konzentrationen und PFOS beobachtet. Keine Assoziationen ergaben sich in diesen Modellen zwischen PFOA und den Gesamt-Cholesterin-Konzentrationen sowie zwischen PFOA bzw. PFOS und Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin oder dem Leberenzym Gamma-Glutamyltransferase.

3.6 Assoziation der Hormonbestimmung, BMI und PDS-Fragebogen - Rückschlüsse auf die Pubertätsentwicklung

Bei den Mädchen werden statistisch signifikante Korrelationen zwischen den Estradiol- und den 17-OHP- und den Testosteron-Konzentrationen, sowie zwischen Testosteron und DHEAS beobachtet. Bei den Jungen sind die 17-OHP- und die DHEAS-Konzentrationen miteinander assoziiert.

Die Estradiol-Konzentrationen der Mädchen steigen mit dem Pubertätsstadium an (Abbildung 4). Das gilt auch für die Testosteron-Konzentration der Jungen (Median 15, Maximum 247 ng/dl) und Mädchen (Median 6,9, Maximum 27 ng/dl).

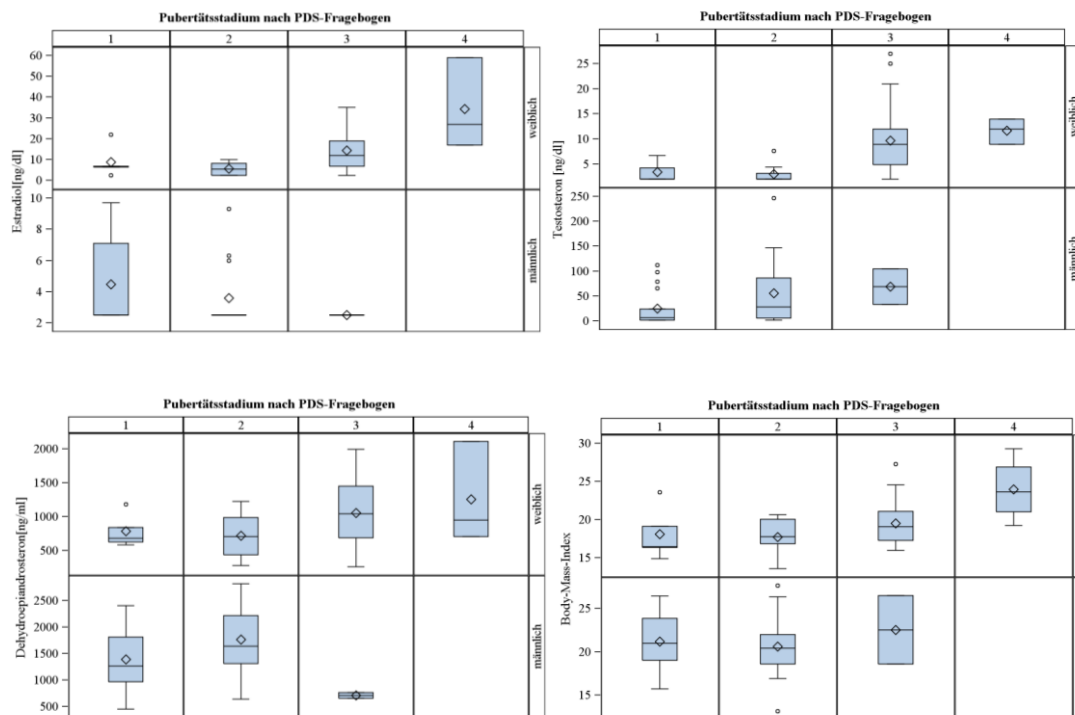


Abbildung 4: Estradiol-, Testosteron-, DHEAS-Konzentrationen und BMI nach PDS-Stadien bei Jungen und Mädchen 2012.

Mit fortschreitendem PDS-Stadium werden höhere DHEAS-Konzentrationen gemessen, die Streuung dieser Messwerte ist höher als bei Estradiol und Testosteron. Der Body-Mass-Index steigt vor allem in den höheren PDS-Stadien an.

In den multivariaten Modellen sind die Daten zum Lebensalter am Tag der Blutentnahme positiv mit den Estradiol-Konzentrationen der Mädchen, den Testosteron-Konzentrationen der Jungen und den DHEAS-Konzentrationen sowohl der Jungen als auch der Mädchen assoziiert. Im Kollektiv der Mädchen geht ein höherer Body-Mass-Index mit höheren DHEAS- und Estradiol-Konzentrationen und einem früheren Zeitpunkt der Menarche einher. Mädchen, die bei der Blutuntersuchung 2012 höhere Estradiolkonzentrationen aufwiesen, haben mit höherer Wahrscheinlichkeit ihre erste Regelblutung erlebt. Bei einer Modellierung des Pubertätsstadiums durch die erhobenen Pubertätsmarker stellen sich Alter ($P = 0,09$), Geschlecht ($P < 0,01$), BMI ($P = 0,01$) und Estradiol ($P = 0,05$) als Einflussfaktoren auf das mittels PDS-Fragebogen erfasste Pubertätsstadium heraus (adjustiert für Schulbildung als Marker des Sozialstatus und Testosteron).

3.7 Unterschiede in der Pubertätsentwicklung bei niedrig und hoch PFAS-belasteten Kindern

Bei den relativ am höchsten PFOA-belasteten Jungen (Messung 2006, oberstes Quartil) werden die niedrigsten mittleren Testosteron-Konzentrationen beobachtet.

Auch die Estradiol-Konzentrationen der Mädchen liegen in der höchstbelasteten Gruppe unterhalb derer mit der niedrigsten PFOA-Konzentration (unteres Quartil), allerdings fallen die mittleren Estradiol-Konzentrationen nicht monoton über die Quartile ab.

Bei den Mädchen sind außerdem die PFOA-Konzentrationen 2012 negativ mit Testosteron, die PFOS-Konzentrationen 2012 negativ mit 17-OHP korreliert (Korrelation nach Spearman, $P < 0,05$). Im Kollektiv der Jungen deutet sich eine negative Assoziation zwischen den Estradiol- und den PFOA-Konzentrationen 2012 an (Korrelation nach Spearman, $P = 0,07$).

Die im Folgenden beschriebenen multiplen Regressionsmodelle sind für die explorative Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen PFAS-Belastung und Pubertätsindikatoren von besonderer Bedeutung.

Im ordinalen Regressionsmodell sind die PFOA-Konzentrationen mit niedrigeren Pubertätsstadien assoziiert ($P = 0,05$ bei den 2006, $P = 0,07$ bei den 2012 gemessenen Konzentrationen).

In den GEE-Modellen gehen zunehmende PFOA-Gehalte mit niedrigeren Testosteronkonzentrationen bei Jungen ($P = 0,09$) und zunehmende PFOS-Gehalte mit niedrigeren Estradiol-Konzentrationen bei Mädchen ($P = 0,06$) einher.

In den logistischen Modellen werden negative Assoziationen zwischen den PFOS (Analyse 2006)- und den Testosteron-Konzentrationen bei Jungen ($P < 0,05$) sowie zwischen den DHEAS- und den PFOA-Konzentrationen beim Vergleich von hoch- mit niedrigbelasteten Mädchen ($P = 0,09$) beobachtet.

In den linearen Modellen weisen PFOS- und DHEAS-Konzentrationen der Mädchen eine negative Assoziation auf ($P = 0,10$). Die linearen Modelle für Estradiol und Testosteron waren auf Grund der hohen Anzahl von Kindern, deren Sexualhormon-Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen, nicht signifikant.

4 Bewertung, Diskussion und Empfehlung

Zur Studie wurden sämtliche Mutter-Kind-Paare der Geburtsjahrgänge 2000 und 2001 eingeladen, die im Herbst 2006 in einem der Arnsberger Stadtteile lebten und an der Einschulungsuntersuchung teilgenommen hatten ($N=348$). Es sollten je 50 Blutproben von Kindern und Müttern analysiert werden. Mit 98 PDS-Fragebögen pro Jahr und insgesamt 157 Blutproben (76 von Kindern und 81 von Müttern) wurden die angestrebten Teilnehmerzahlen deutlich überschritten.

Zum Zeitpunkt der letzten PDS-Erhebung im Herbst 2013 hatten 46 % der Mädchen und 9 % der Jungen das Pubertätsstadium IV (fortgeschrittene Pubertät) erreicht, bei

24 der 50 Mädchen hatte die Menarche stattgefunden. Die Blutentnahme fand wie geplant ein Jahr vor der letzten PDS-Erhebung statt, so dass die Analyse der Hormonkonzentrationen bei 52 % der Jungen (10 % der Mädchen) in der Vorpubertät (gemäß PDS-Fragebogen) erfolgte. Die vorliegende Auswertung stützt sich damit auf einen hinsichtlich der Entwicklung des Pubertätsstatus unvollständigen Datensatzes. Es wäre wünschenswert, wenn die Erfassung so lange fortgeführt würde, bis die Mehrheit wenigstens das Stadium der fortgeschrittenen Pubertät erreicht hat. Es erscheint wahrscheinlich, dass dieses Ziel mit zwei weiteren jährlichen Untersuchungen jeweils im Herbst 2014 und 2015 erreicht werden könnte.

Die PFOA-Plasmakonzentrationen der Kinder lagen 2012 im geometrischen Mittel bei 5,1 µg/l, die der Mütter bei 5,2 µg/l. Der Referenzwert der HBM-Kommission für PFOA wird in 10 % aller Blutplasmaproben überschritten (14 Mütter, 1 Kind). Die PFOA-Belastung ist seit der ersten Human-Biomonitoring-Studie 2006 deutlich, im geometrischen Mittel um ca. 75 % bei Kindern und Müttern, gesunken. Die mittleren PFOS-Plasmakonzentrationen waren niedriger, sie betragen 3 µg/l (Mütter) bzw. 2,8 µg/l (Kinder). Bei PFOS wurden 2012 um 41 % (Jungen) bzw. 45 % (Mädchen) sowie 49 % (Mütter) niedrigere Konzentrationen beobachtet als 2006.

Die Erfassung des Pubertätsstatus mittels PDS-Fragebogen wurde zur Stadieneinteilung der Pubertät genutzt. Bei Mädchen sind höhere Estradiol-Konzentrationen in den fortgeschrittenen Pubertätsstadien zu beobachten. Die Testosteron-Konzentrationen der Jungen (Median 15, Maximum 247 ng/dl) und der Mädchen (Median 6,9, Maximum 27 ng/dl) nehmen mit dem Fortschritt der Pubertät zu. In den fortgeschrittenen PDS-Stadien werden höhere DHEAS-Konzentrationen gemessen, die Streuung dieser Messwerte ist höher als bei Estradiol und Testosteron. Der Body-Mass-Index steigt vor allem in den höheren PDS-Stadien an.

In der explorativen Auswertung ergeben die multivariaten logistischen, ordinalen und linearen Modelle bzw. die GEE-Modellierungen plausible Assoziationen zwischen den verschiedenen erhobenen Markern der Pubertätsentwicklung. Die Daten zum Lebensalter am Tag der Blutentnahme sind positiv mit den Estradiol-Konzentrationen der Mädchen, den Testosteron-Konzentrationen der Jungen und den DHEAS-Konzentrationen sowohl der Jungen als auch der Mädchen assoziiert. Im Kollektiv der Mädchen geht ein höherer Body-Mass-Index mit höheren DHEAS- und Estradiol-Konzentrationen und einem früheren Zeitpunkt der Menarche einher. Bei Jungen sind BMI und Testosteron-Konzentrationen negativ assoziiert. Bei einer Modellierung des Pubertätsstadiums durch die erhobenen Pubertätsmarker stellen sich Alter, Geschlecht, BMI und Estradiol als Einflussfaktoren auf das mittels PDS-

Fragebogen erfasste Pubertätsstadium heraus (adjustiert für Schulbildung als Marker des Sozialstatus, Testosteron).

Werden in dem zuletzt beschriebenen Modell zusätzlich die PFOA-Konzentrationen berücksichtigt, so sind diese mit niedrigeren Pubertätsstadien assoziiert. In den GEE-Modellen gehen zunehmende PFOA-Gehalte mit niedrigeren Testosteronkonzentrationen bei Jungen und zunehmende PFOS-Gehalte mit niedrigeren Estradiol-Konzentrationen bei Mädchen einher. In den logistischen Analysen werden außerdem negative Assoziationen zwischen den PFOS- (Analyse 2006) und den Testosteron-Konzentrationen bei Jungen beobachtet. DHEAS ist bei den Mädchen schwach negativ mit PFOS assoziiert (lineares Modell). Alle vorgenannten Assoziationen sind überwiegend schwach signifikant ($0,05 \leq P < 0,1$, s Abschnitt 3.7, Seite 11).

Die hier beschriebenen Assoziationen sind prinzipiell mit der Hypothese einer Verzögerung der Pubertätsentwicklung durch PFOA bzw. PFOS vereinbar, wie sie derzeit wissenschaftlich diskutiert wird.

Die übrigen multivariaten Analysen (Kapitel 3.7) ergeben keine eindeutigen, signifikanten Assoziationen der analysierten Pubertätsmarker mit PFOA oder PFOS.

Die Daten müssen vor dem Hintergrund der relativ geringen Stichprobengröße, der bekannten hohen interindividuellen Variabilität der Pubertätsentwicklung und des begrenzten Anteils von Probanden in den fortgeschrittenen Pubertätsstadien diskutiert und dementsprechend mit Vorsicht interpretiert werden. Es ist derzeit kein (patho-) physiologisches Modell bekannt, welches die biologischen und biochemischen Mechanismen, die einer Assoziation der Pubertätsentwicklung mit der PFAS-Belastung beim Menschen zugrunde liegen könnten, hinreichend schlüssig belegt.

Es wird empfohlen, das Kollektiv zunächst zur Beobachtung des Pubertätsfortschritts weiter mit dem Instrumentarium der vorliegenden Studie zu untersuchen (bis 2015).

5 Literatur

- Apelberg, B. J., Goldman, L. R., Calafat, A. M., Herbstman, J. B., Kuklenyik, Z., Heidler, J., Needham, L. L., Halden, R. U., Witter, F. R. (2007a). Determinants of fetal exposure to polyfluoroalkyl compounds in Baltimore, Maryland. *Environ Sci Technol* 41(11): 3891-7.
- Apelberg, B. J., Witter, F. R., Herbstman, J. B., Calafat, A. M., Halden, R. U., Needham, L. L., Goldman, L. R. (2007b). Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect* 115(11): 1670-6.
- Brook, C. G. (1971). Determination of body composition of children from skinfold measurements. *Arch Dis Child* 46(246): 182-4.
- Carskadon, M. A., Acebo, C. (1993). A Self-Administered Rating-Scale for Pubertal Development. *Journal of Adolescent Health* 14(3): 190-195.
- Chan, N. P., Sung, R. Y., Nelson, E. A., So, H. K., Tse, Y. K., Kong, A. P. (2010). Measurement of pubertal status with a Chinese self-report Pubertal Development Scale. *Matern Child Health J* 14(3): 466-73.
- EFSA (2014). European Food Safety Authority. Extensive literature search and provision of summaries of studies related to the oral toxicity of perfluoroalkylated substances (PFASs), their precursors and potential replacements in experimental animals and humans. EN-572. www.efsa.europa.eu/publications. Zuletzt abgerufen am: 15. Mai 2014.
- Elmlinger, M. W., Kuhnel, W., Wormstall, H., Doller, P. C. (2005). Reference intervals for testosterone, androstenedione and SHBG levels in healthy females and males from birth until old age. *Clin Lab* 51(11-12): 625-32.
- Fei, C., McLaughlin, J. K., Tarone, R. E., Olsen, J. (2007). Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 115(11): 1677-82.
- Fei, C., McLaughlin, J. K., Tarone, R. E., Olsen, J. (2008). Fetal growth indicators and perfluorinated chemicals: a study in the Danish National Birth Cohort. *Am J Epidemiol* 168(1): 66-72.
- Hölzer, J., Midasch, O., Rauchfuss, K., Kraft, M., Reupert, R., Angerer, J., Kleeschulte, P., Marschall, N., Wilhelm, M. (2008). Biomonitoring of perfluorinated compounds in children and adults exposed to perfluorooctanoate-contaminated drinking water. *Environ Health Perspect* 116(5): 651-7.
- Jensen, A. A., Leffers, H. (2008). Emerging endocrine disruptors: perfluoroalkylated substances. *Int J Androl* 31(2): 161-9.
- Kulle, A. E., Riepe, F. G., Melchior, D., Hiort, O., Holterhus, P. M. (2010). A novel ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in pediatric blood samples: age- and sex-specific reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 95(5): 2399-409.
- LANUV (2011). LANUV-Fachbericht 34. Verbreitung von PFT in der Umwelt. Ursachen – Untersuchungsstrategie – Ergebnisse – Maßnahmen. <http://www.lanuv.nrw.de/veroeffentlichungen/fachberichte/fabe34/fabe34start.htm>. Zuletzt abgerufen am:
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci* 99(2): 366-94.
- Lopez-Espinosa, M. J., Fletcher, T., Armstrong, B., Genser, B., Dhatriya, K., Mondal, D., Ducatman, A., Leonardi, G. (2011). Association of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) with age of puberty among children living near a chemical plant. *Environ Sci Technol* 45(19): 8160-6.
- Nolan, L. A., Nolan, J. M., Shofer, F. S., Rodway, N. V., Emmett, E. A. (2009). The relationship between birth weight, gestational age and perfluorooctanoic acid (PFOA)-contaminated public drinking water. *Reprod Toxicol* 27(3-4): 231-8.

- Olsen, G. W., Gilliland, F. D., Burlew, M. M., Burris, J. M., Mandel, J. S., Mandel, J. H. (1998). An epidemiologic investigation of reproductive hormones in men with occupational exposure to perfluorooctanoic acid. *J Occup Environ Med* 40(7): 614-22.
- Olsen, G. W., Logan, P. W., Hansen, K. J., Simpson, C. A., Burris, J. M., Burlew, M. M., Vorarath, P. P., Venkateswarlu, P., Schumpert, J. C., Mandel, J. H. (2003). An occupational exposure assessment of a perfluorooctanesulfonyl fluoride production site: biomonitoring. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J. (Fairfax, Va)* 64(5): 651-9.
- Petersen, A. W., Crockett, L., Richards, M., Boxer, A. (1988). A Self-Report Measure of Pubertal Status: Reliability, Validity, and Initial Norms. *Journal of Youth and Adolescence* 17(No. 2): 117-133.
- Siri, W. E. (1956). The gross composition of the body. *Advances in biological and medical physics* 4: 239-80.
- Skutlarek, D., Exner, M., Farber, H. (2006). Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. *Environ Sci Pollut Res Int* 13(5): 299-307.
- Thomas, L. (2005). *Labor und Diagnose*. Frankfurt/ Main, TH-Books Verlagsgesellschaft.
- Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen (2014). Leistungsverzeichnis des Hormonlabors der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen. Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Pädiatrische Endokrinologie. <http://www.medizin.uni-tuebingen.de/kinderklinik/de/laborleistungen/hormonlabor/leistungsverzeichnis-hormonlabor-2014.pdf>. Zuletzt abgerufen am: 16.05.2014.
- van Helden, J., Roelofs, S., Darte, C., Artus, A. (2011). Pediatric thyroid reference intervals tanner stage- or age-stratified on a German population. *CLINICAL BIOCHEMISTRY* 44(7): 522.
- Watzlawik, M. (2009). Die Erfassung des Pubertätsstatus anhand der Pubertal Development Scale. *Diagnostica* 55(1): 55-65.

1 Introduction

1.1 Background

In 2006, increased concentrations of per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) were detected in the drinking water of waterworks of the Hochsauerland-Area, North Rhine-Westphalia. Perfluorooctanoic acid (PFOA) was the main component (50-80 %). PFOA levels up to 0.52 µg/l were detected in drinking water from waterworks which were supplied with raw water from the Ruhr and Moehne rivers [Skutlarek et al. 2006]. It was found that this contamination was caused by the application of industrial waste on agricultural land. On behalf of the Federal State North-Rhine Westphalia, the Department of Hygiene, Social and Environmental Medicine, Ruhr-University Bochum (RUB) designed a prospective cross-sectional study. Plasma concentrations of perfluorinated compounds were analysed in 2006 in 5 to 6-year-old children, their mothers and men. According to the State Office for Nature, Environment and Consumer Protection of North Rhine Westphalia (LANUV NRW), all mother-child pairs were exposed to increased PFOA concentrations via drinking water between 2004 and 2006 [LANUV 2011]. The plasma concentrations in 2006 were about 4-8 times higher than in non-exposed control groups [Hölzer et al. 2008]. The study cohort, which in addition to the mother-child pairs also included about 70 mothers and 100 men from Arnsberg, has been repeatedly investigated by the Department of Hygiene, Social and Environmental Medicine of the RUB in the years 2007, 2008 and 2010. The main observation of these follow-up studies was the decline in internal PFOA burden. In July 2006, activated charcoal filters were installed that efficiently decreased PFOA concentrations in drinking water to levels predominantly under the limit of quantification (LOQ).

The increased, now slowly declining internal PFOA burden of about 40,000 citizens of Arnsberg requires further observation for reasons of preventive health protection. Since chronic effects of PFAS are the subject of current scientific discussion, puberty development in children of Arnsberg is examined.

1.2 Evidence of developmental toxicity of PFAS

An extensive literature compilation of animal experiments and human observational studies was currently published by the European Food Safety Authority [EFSA 2014]. Teratogenic effects of PFOS were usually observed only at maternal toxic doses. In contrast, the administration of PFOS to pregnant animals resulted in dose-dependent damage in the offspring. It seems that prenatal exposure plays a crucial role. Morbidity and mortality of offspring were associated with the body load of PFOS (liver and serum levels). In rats and mice, the effects were nearly

identical. In other species (chicken, quail) developmental toxicity of PFOA were observed too. Surviving offspring showed developmental deficits after prenatal exposure (e.g. delayed weight gain, neurological deficits).

There are only a few studies about developmental toxicity of perfluorinated compounds in humans. Fei et al. [2007, 2008] found a negative association between PFOA levels in maternal plasma (exposure in the range of background levels) and birth weight. Apelberg et al. [2007a; 2007b] observed a negative association between PFOS and PFOA concentrations in cord blood and birth weight as well as body size. The effects were slight, however. No association was observed between elevated PFOA concentrations and reduced birth weight in a study Little Hocking, USA, where the population has been exposed mainly to PFOA via drinking water [Nolan et al. 2009].

Suppression of thyroid hormones has been observed in animal experiments [Lau et al. 2007]. Interactions with sex hormones differed according to the type of perfluorinated compound [Jensen und Leffers 2008]. In several studies, decreased testosterone and increased estradiol serum concentrations were concurrently observed after administration of PFOA to male rats [Lau et al. 2007]. Furthermore, the influence on sex hormone levels has been associated with the induction of Leydig cell adenoma in chronic PFOA-exposed rats. In all known human studies including of highly exposed workers, no likewise associations between exposure to perfluorinated compounds and influences on thyroid hormone or sex hormone status have been detected. However, in a study among workers exposed to high levels of PFOA an increase of 17-hydroxyprogesterone alpha, a testosterone precursor, with elevated PFOA levels was observed [Olsen et al. 1998]. In subgroups, a significant association with TSH concentrations was observed. Olsen et al. [2003] found evidence, that the T3 serum concentration increases with the PFOS and PFOA burden. Overall, the results from the animal model do not seem to be consistent with the human data. But a modulation of thyroid hormones by high exposure to perfluorinated compounds seems to be possible.

A publication of the C8 Science Panel reported an average delay of puberty in girls by 130 days in the highest PFOA-exposed group compared with the lowest exposed group of the study population² [Lopez-Espinosa et al. 2011].

²http://www.c8sciencepanel.org/pdfs/Status_Report_C8_and_puberty_27Sept2010.pdf

1.3 Aim

Possible health effects of perfluorinated compounds on children's health, especially the pubertal development, are to be investigated in mother-child pairs from the Arnsberg population exposed to PFOA via drinking water.

2 Methods

2.1 Health questionnaire

In 2012 and 2013, a self-administered questionnaire (health questionnaire) was sent to the study participants. In addition to child height and weight, exposure to tobacco smoke, as well as disease conditions and medication were asked.

2.2 Pubertal development scale questionnaire

The investigation of pubertal development was performed using the PDS (pubertal development scale) questionnaire [Petersen et al. 1988; Carskadon und Acebo 1993; Watzlawik 2009]. This permits the differentiation of pubertal stages in boys and girls based on different anamnestic criteria. The manifestation of secondary sexual characteristics was rated by a parent (mother).

Five stages of puberty development are ascertained: prepubertal (stage I), beginning puberty (stage II), in mid-puberty (stage III), advanced puberty (stage IV) and post-puberty (stage V). According to Watzlawik [2009], a point value was given for each response option. The indication for menarche was not summarized as a numerical value in the calculation, but was considered as an additional criterion. Point totals are calculated from 2 (♀ ; armpit/pubic hair and breast growth [+ additional criterion menarche]) or 3 questions (♂ ; armpit/pubic hair, beard growth, deepening of the voice). As reported by Chan et al. [2010], the point values are added together and assigned to a pubertal stage.

2.3 PFAS human biomonitoring, sex hormones and clinical-chemical and hematological metrics

PFAS in blood plasma were measured by solid phase extraction, HPLC and MS/MS detection. Analyses were carried out by the Institute and Outpatient Clinic of Occupational, Social and Environmental. Medicine, University Erlangen-Nürnberg, Germany.

The determination of the sex hormones was carried out by the laboratory of the Department of Paediatric and Adolescent Medicine, Tübingen via radio, chemiluminescence and competitive enzyme immunoassays.

Blood count, cholesterol- and thyroid hormone-concentrations were determined at the Institute of Clinical Chemistry, Transfusion and Laboratory Medicine at the University Clinic Bergmannsheil, Bochum with established methods.

2.4 Anthropometric measurements

The children were weighed during the examination in 2012. In addition, body size, waist and hip circumference were measured. In 2013, body weight and height were collected by questionnaire again. The body mass index (weight [kg] / size [m]²) was calculated based on the physical examination (2012) or questionnaires (2013).

The determination of body fat was performed using calipometry (skin fold thickness measurement) and subsequent calculation according to Siri [1956] and Brook [1971].

81 anthropometric measurements were performed.

2.5 Data analysis / statistics

Differences between groups were tested using appropriate methods (e.g. t-test of the log data or Wilcoxon rank-sum test). A possible monotonic or linear relationship between puberty indicators, confounders and PFAS concentrations was checked by Spearman correlation coefficient and Bravais-Pearson correlation coefficient.

The influence of blood concentrations of perfluorinated compounds on the target variables (hormone concentrations, clinical-chemical parameters) was analyzed with multivariate methods (multiple linear regression and logistic regression), adjusted for possible confounders. In addition, the linear model and the logistic model was used to analyze longitudinally measured variables in a GEE (Generalized Estimating Equations) model. The PDS stages were modeled using an ordinal regression.

The data analysis was performed using SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina 27513, USA).

2.6 Blood collection and interview on day of examination 2012

81 mother-child pairs were examined between October 8 to November 23, 2012, in the premises of the local health office in Arnsberg, Germany. 76 blood samples from children and 81 from mothers were collected.

PFOA, PFOS, PFHxS, PFBS, PFPA, PFNA and PFHxA were measured in the blood samples of mothers and children. Additionally, the children's blood samples were analyzed for:

- blood count
- total and LDL-, HDL- cholesterol, GOT, GPT, γ GT, CRP

- thyroid hormones T3, T4, FT3, FT4, TSH
- sex hormones testosterone, estradiol, hormone precursors DHEA-S and 17-OHP

The blood samples were cooled right after drawing at 4-8 ° C and processed on the same day.

Information on drinking water consumption and eating behavior of mother and child, on pregnancies and pregnancy complications (since 2003), as well as the social status, was collected by trained interviewers from 81 mother-child pairs.

3 Results

3.1 Participation

The study was conducted from 2011 to 2013. All mother-child pairs of the birth cohort 2000 and 2001, who had lived in one of the districts of Arnsberg Holzen, Bruchhausen, Neheim, Hüsten or Herdringen in the autumn of 2006 and had participated in the school enrollment examination, were invited to the study. A total of 99 mother-child pairs confirmed their participation in the study from 2011 to 2014.

Every autumn from 2011 to 2013, a copy of the PDS questionnaire was filled out by the children's mothers. In autumn 2012, blood samples were taken from 76 children and 81 mothers.

3.2 Status of sexual development

In 2011, 77 % of boys still showed no signs of pubertal changes in beard growth, voice, and armpit/ pubic hair development. These boys were in stage I of pubertal development (pre-puberty, criteria of PDS scores according to Watzlawik [2009]). 23 % of the boys had at least reached stage II (starting at puberty). The boys were 10.4 to 11.9 years old (median: 11.1 years).

In 2012, about half of all boys were still in puberty stage I. In 2013, the percentages from 2011 had been reversed: Only 23 % of boys were in pubertal stage I, 28 % in stage II, 40 % in stage III (mid-puberty) and 9 % in stage IV (advanced puberty). At this time, none of them had reached stage V (post-puberty). The boys' ages ranged from 12.3 to 13.8 years (median 13.0 years) at this time. Figure 1 gives an overview of the proportions of boys' and girls' puberty states between 2011 and 2013.

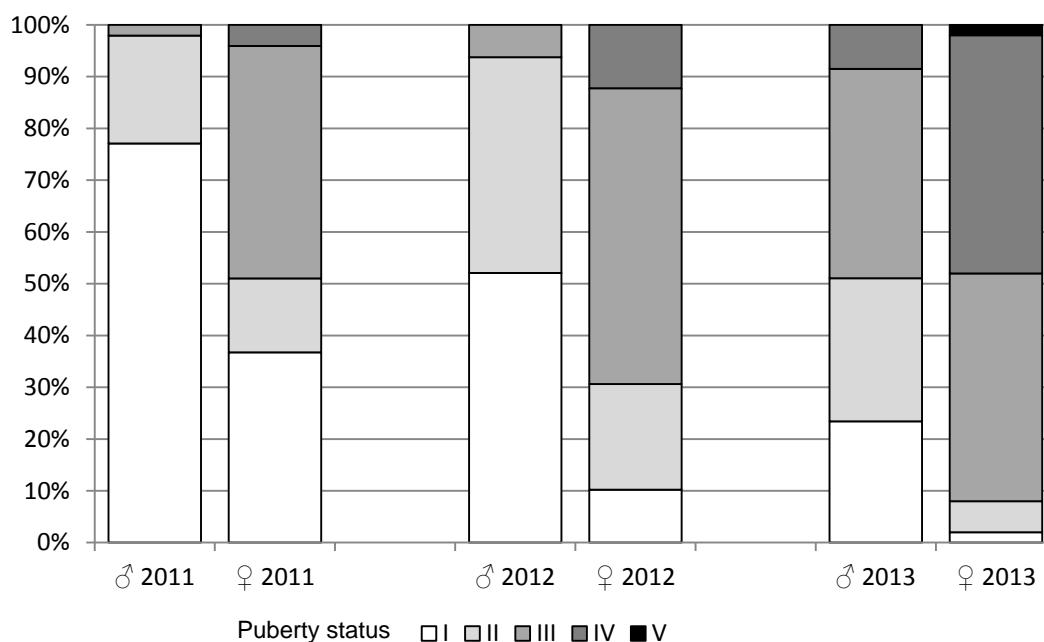


Figure 1: Puberty status 2011 - 2013 according to PDS questionnaire from 48 boys and 50 girls.

In 2011, 37 % of the girls showed neither onset of breast growth, nor growth of armpit/pubic hair. Menarche had not yet occurred (stage I). 14 % had reached stage II, and 45 % stage III. Menarche was reported from 4 % of girls in that year (stage IV). The girls' ages ranged between 10.4 and 11.9 years (median 11.1 years).

In 2012, 10 % of girls were in puberty stage I. That number declined to only one (2 %) in 2013, when 46 % of girls had reached pubertal stage IV and 44 % stage III. At this time, girls were between 12.4 and 13.5 years old (median 12.9 years).

3.3 Concentrations of hormones, sexual hormones, pre-hormones and clinical-chemical parameters

Table 1 gives an overview of the concentrations of the sex hormones and hormone precursors, thyroid hormones and cholesterol.

Table 1: Thyroid and sex hormones, cholesterol concentrations of children compared to reference ranges.

		N	Mean _{geom}	Min	Max	Ref. range	N _{>Ref}	N _{<Ref}	Ref.
Total cholesterol [mg/dl]	♂	33	173.5	96	237	<220	3		[Thomas 2005]
	♀	41	174.9	96	231	<220	3		
LDL cholesterol [mg/dl]	♂	33	88.2	46	144	<130	3		
	♀	41	90.5	40	158	<130	3		
HDL cholesterol [mg/dl]	♂	33	54.5	29	99	>35		1	
	♀	41	58.7	35	97	>35			
TT3 [µg/l]	♂	33	1.5	1.2	2	0.8-2.1			
	♀	41	1.5	1.1	2	0.8-2.1			

		N	Mean _{geom}	Min	Max	Ref. range	N _{>Ref}	N _{<Ref}	Ref.
TT4 [$\mu\text{g/l}$]	♂	33	79.7	62	108	49-107			
	♀	41	76.7	61	104	49-107			
FT3 [pmol/l]	♂	33	5.8	4.7	11.1	4.6-7.1	2		[van Helden et al. 2011]
	♀	41	5.8	3.9	8.3	4.1-7.2	7	1	
FT4 [ng/l]	♂	33	7.6	6	10	7-12		5	
	♀	41	7.1	5	10	7-12		12	
TSH [mIU/l]	♂	33	2.1	1	7.4	1.1-5.3	1	1	[van Helden et al. 2011]
	♀	41	1.8	0.77	4.7	1.1-5.3	1	5	
DHEAS [ng/ml]	♂	33	1367	454	2822	118-3732			[Elmlinger et al. 2005]
	♀	43	879	264	2108	247-2255			
Estradiol [pg/ml]	♂	33	<BG	<BG	9.7	7.1-481		27	[Elmlinger et al. 2005]
	♀	43	10.3	<BG	240	<BG-60.2	1	7	
Testosterone [ng/dl]	♂	33	14.2	<BG	247	3-161	1	9	[Kulle et al. 2010]
	♀	43	5.9	<BG	27	3-43		12	
17-OHP	♂	33	38.4	15	92	<160			Binder*
	♀	43	38.2	8.2	113	<160			

*[Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen 2014]

3.4 PFAS-biomonitoring in mothers and children

In 2012, PFOA-concentrations averaged 5.1 $\mu\text{g/l}$ in children (geometric mean), and 5.2 $\mu\text{g/l}$ in mothers (geometric mean). The reference value of the HBM commission for PFOA was exceeded in 10 % of blood plasma samples (14 mothers and 1 child). Higher maximum PFOA blood plasma concentrations were observed in the group of mothers compared to the children (Figure 2).

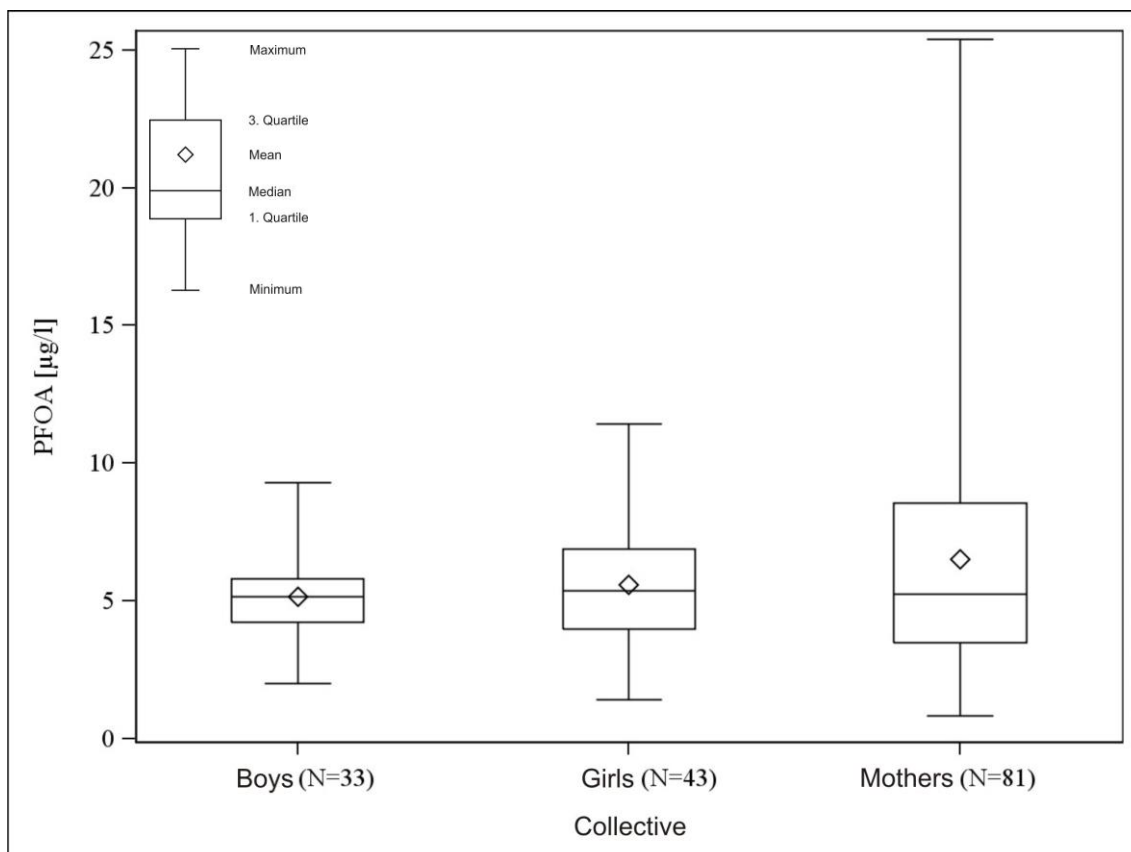


Figure 2: PFOA concentrations of boys, girls and mothers in 2012.

The PFOS plasma concentrations were 3.0 µg/l (mothers; geometric mean) and 2.8 µg/l (children; geometric mean). The highest concentration found in children was 10.2 µg/l. The PFOA and PFOS concentrations did not differ significantly between boys and girls.

PFHxS concentrations ranged from 0.2 µg/l to 3.6 µg/l. The geometric mean was 0.7 µg/l in children and 0.6 µg/l in mothers. Girls showed slightly higher concentrations than boys, but the difference is only weakly significant ($P = 0.08$).

PFBS was detectable in 10 % of all analyzed plasma samples. The highest concentration in the total cohort was 0.2 µg/l.

In 93 % of the samples, PFNA concentrations above the detection limit of 0.3 µg/l were detected. The highest concentration was measured in a mother (3.4 µg/l). No significant differences between boys and girls were observed.

PFPA and PFHxA were not detected in any of the examined blood samples.

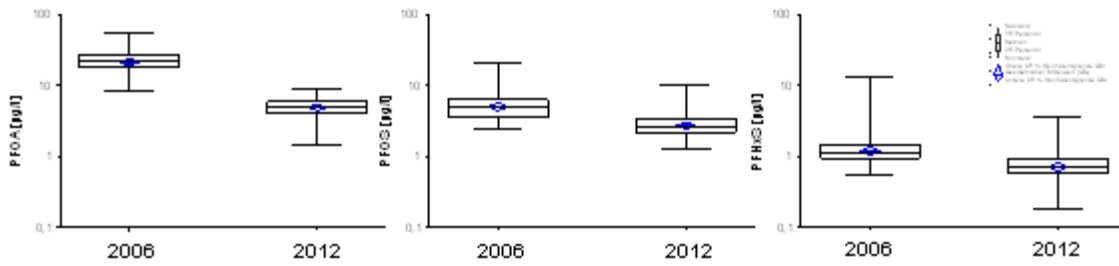


Figure 3: PFOA-, PFOS- and PFHxS-concentrations of children compared between 2006 and 2012. Logarithmic scale.

3.5 Associations between PFOA/PFOS and metabolic measurements and gamma-glutamyl transferase

In GEE models, total cholesterol concentrations were found to be associated with PFOS-concentrations ($P < 0.05$). However, neither between PFOA and total cholesterol nor between PFOA or PFOS and low-density lipoprotein-cholesterol or liver enzyme gamma-glutamyl transferase statistically significant associations were observed.

3.6 Associations between hormones, BMI, and PDS-questionnaire

Statistically significant correlations between estradiol, 17-OHP and testosterone concentrations and between testosterone and DHEAS concentrations are observed in the group of the girls. For the boys, the 17-OHP and DHEAS concentrations are associated with each other.

In girls, higher estradiol concentrations are observed in the advanced stages of puberty. The testosterone concentrations in boys (median 15, maximum 247 ng/dl) and girls (median 6.9, maximum 27 ng/dl) increase with the progress of puberty (Figure 4).

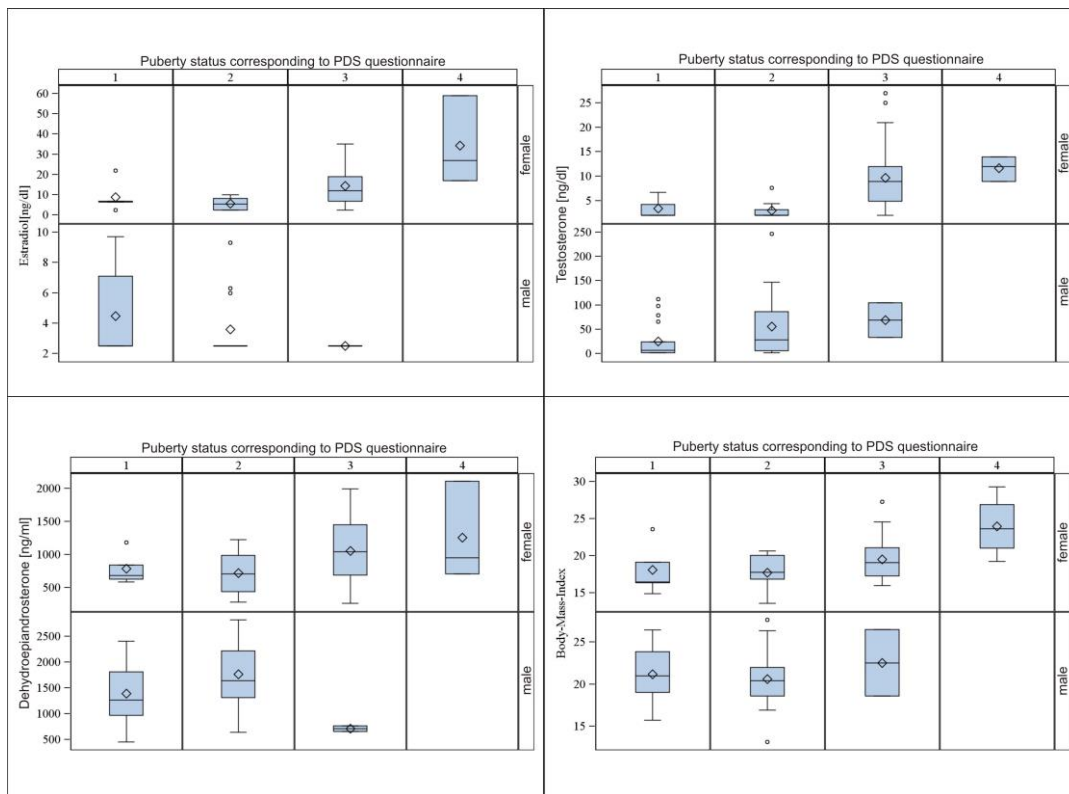


Figure 4: Estradiol, testosterone, and DHEAS concentrations and BMI according to PDS stages in boys and girls 2012.

In the advanced stages of PDS, higher DHEAS concentrations are measured. The variation of these values is higher than that of estradiol and testosterone. The body mass index increases, especially in the higher PDS stages.

In the multivariate model, age at the time of blood sampling is positively associated with estradiol concentrations of the girls, testosterone levels of boys and DHEAS concentrations of boys and girls. Girls' body mass index is associated positively with DHEAS- and estradiol concentrations as well as an earlier age at menarche. Girls with higher levels of estradiol in 2012 are more likely to experience their first menstrual period during the study period. Age ($P = 0.09$), gender ($P < 0.01$), BMI ($P = 0.01$) and estradiol ($P = 0.05$) turned out to be influencing factors on the stage of puberty assessed by PDS questionnaire (adjusted for education as a marker of social status and testosterone).

3.7 Puberty development in low and high PFAS-exposed children

The lowest mean testosterone concentrations are observed in the relatively highest PFOA-exposed boys (measurement in 2006, top quartile). Additionally, the estradiol concentrations of the highest PFOA exposed girls (upper quartile) are below those with the lowest concentrations (lower quartile). However, mean estradiol concentrations do not decrease monotonically over the quartiles.

In 2012, the PFOA concentrations of the girls were negatively associated with testosterone levels, while the PFOS concentrations were negatively correlated with 17-OHP (Spearman correlation, $P < 0.05$). In the group of boys, a weak negative association between estradiol and PFOA concentrations (Spearman correlation, $P = 0.07$) was observed.

Multiple regression models are of particular importance for the exploratory analysis of possible relationships between PFAS exposure and markers of pubertal development.

In ordinal regression models, PFOA concentrations are associated with lower puberty stages ($P = 0.05$, PFOA measured in 2006, $P = 0.07$ for PFOA measured in 2012).

In GEE-Models negative associations are observed between PFOA and testosterone concentrations in boys ($P = 0.09$) and between PFOS and estradiol concentrations in girls ($P = 0.06$).

Logistic regression models reveal negative associations between PFOS (analysis 2006) and testosterone concentrations in boys ($P < 0.05$) and between PFOA and DHEAS concentrations in girls ($P = 0.09$).

In linear models, negative associations between PFOS and DHEAS concentrations in girls are observed ($P = 0.10$). Due to the high number of children whose sex hormone concentrations were below the limit of quantitation, linear models for estradiol and testosterone turned out to be not significant.

4 Summary and conclusions

All mother-child pairs of the birth cohort 2000 and 2001, who had lived in one of the districts of Arnsberg Holzen, Bruchhausen, Neheim, Hüsten or Herdringen during autumn 2006 and had participated in the school enrollment examination ($N = 348$), were invited to the study. It was initially planned to analyse blood samples of 50 children. The actual numbers of 98 PDS questionnaires per year and a total of 157 blood samples (76 children and 81 mothers) clearly exceeded the intended number of participants

46 % of girls and 9 % of boys had reached the puberty stage IV (advanced puberty) in 2013. 24 of 50 girls reported menarche. Blood sampling was performed a year before the last PDS survey, so that the analysis of hormone concentrations in 52 % of boys (10 % of girls) took place during pre-puberty (according to PDS questionnaire). The present analysis is thus based on incomplete data regarding the puberty status. It would be desirable to continue the surveillance until the majority of children had

reached the advanced stage of puberty. This goal could probably be achieved with two additional annual surveys in autumn 2014 and 2015.

In 2012, PFOA concentrations of children averaged 5.1 µg/l, and those of mothers 5.2 µg/l (geometric means). The reference value of the HBM commission for PFOA was exceeded in 10 % of blood plasma samples (14 mothers, 1 child). Since the first HBM study in 2006, PFOA exposure of children and mothers has significantly decreased by approximately 75 % (geometric means). PFOS plasma concentrations were lower: 3 µg/l (mothers) and 2.8 µg/l (children). PFOS concentrations in 2012 were 41 %, 45 %, and 49 % lower than in 2006 for boys, girls, and mothers, respectively.

Puberty status was assessed by PDS questionnaire. In girls, higher estradiol concentrations in the advanced stages of puberty are observed. With progression of puberty, testosterone concentrations of boys (median 15, maximum 247 ng/dl) and girls (median 6.9, maximum 27 ng/dl) increase. In advanced PDS stages higher DHEAS concentrations are measured. Variation of these values is higher than for estradiol and testosterone. Body mass index increases especially in higher PDS stages.

In the exploratory analysis, the multivariate logistic, ordinal and linear models, and the GEE models yield plausible associations. Age at blood sampling is positively associated with the estradiol concentrations of the girls. Testosterone concentrations of the boys and the DHEAS concentrations of both, the boys and girls are associated with age. A higher body mass index is associated with higher DHEAS and estradiol concentrations and earlier menarche. In boys, BMI and testosterone concentrations are negatively associated. Age, gender, BMI and estradiol turned out to be influencing factors on the stage of puberty assessed by PDS questionnaire (adjusted for education as a marker of social status and testosterone).

In the same model, PFOA concentrations are associated with lower pubertal stages. In GEE modeling, increasing PFOA concentrations are associated with decreased testosterone concentrations in boys and increasing PFOS concentrations with decreased estradiol concentrations in girls. Logistic regression analyses reveal negative associations between PFOS (Analysis 2006) and testosterone concentrations in boys. DHEAS is weakly negatively associated with PFOS (linear model) in girls. Almost all of the associations described above are weakly significant ($0.05 \leq P < 0.1$, see Section 3.7, page 26).

The aforementioned associations basically support the hypothesis of a delay in pubertal development in PFOA/PFOS-exposed adolescents, which is actually under scientific discussion.

The remaining multivariate analyses (Section 3.7) did not reveal any significant associations between the analysed markers of pubertal development and PFOA or PFOS.

Results should be discussed taking into account the relatively small sample size, the known (large) interindividual variability of pubertal development and the fact, that a substantial part of the study cohort has not reached advanced pubertal stages during the study period. Therefore, results should be interpreted with caution. Currently, no commonly accepted (patho-) physiological model exists, which might explain the biological and biochemical mechanisms underlying the suspected association of PFAS exposure with age of puberty.

It is recommended to follow up the pubertal development of the cohort with the same study instruments until 2015.

5 References

- Apelberg, B. J., Goldman, L. R., Calafat, A. M., Herbstman, J. B., Kuklennyik, Z., Heidler, J., Needham, L. L., Halden, R. U., Witter, F. R. (2007a). Determinants of fetal exposure to polyfluoroalkyl compounds in Baltimore, Maryland. *Environ Sci Technol* 41(11): 3891-7.
- Apelberg, B. J., Witter, F. R., Herbstman, J. B., Calafat, A. M., Halden, R. U., Needham, L. L., Goldman, L. R. (2007b). Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect* 115(11): 1670-6.
- Brook, C. G. (1971). Determination of body composition of children from skinfold measurements. *Arch Dis Child* 46(246): 182-4.
- Carskadon, M. A., Acebo, C. (1993). A Self-Administered Rating-Scale for Pubertal Development. *Journal of Adolescent Health* 14(3): 190-195.
- Chan, N. P., Sung, R. Y., Nelson, E. A., So, H. K., Tse, Y. K., Kong, A. P. (2010). Measurement of pubertal status with a Chinese self-report Pubertal Development Scale. *Matern Child Health J* 14(3): 466-73.
- EFSA (2014). European Food Safety Authority. Extensive literature search and provision of summaries of studies related to the oral toxicity of perfluoroalkylated substances (PFASs), their precursors and potential replacements in experimental animals and humans. EN-572. www.efsa.europa.eu/publications. Zuletzt abgerufen am: 15. Mai 2014.
- Elmlinger, M. W., Kuhnel, W., Wormstall, H., Doller, P. C. (2005). Reference intervals for testosterone, androstenedione and SHBG levels in healthy females and males from birth until old age. *Clin Lab* 51(11-12): 625-32.
- Fei, C., McLaughlin, J. K., Tarone, R. E., Olsen, J. (2007). Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 115(11): 1677-82.
- Fei, C., McLaughlin, J. K., Tarone, R. E., Olsen, J. (2008). Fetal growth indicators and perfluorinated chemicals: a study in the Danish National Birth Cohort. *Am J Epidemiol* 168(1): 66-72.
- Hölzer, J., Midasch, O., Rauchfuss, K., Kraft, M., Reupert, R., Angerer, J., Kleeschulte, P., Marschall, N., Wilhelm, M. (2008). Biomonitoring of perfluorinated compounds in children and adults exposed to perfluorooctanoate-contaminated drinking water. *Environ Health Perspect* 116(5): 651-7.
- Jensen, A. A., Leffers, H. (2008). Emerging endocrine disruptors: perfluoroalkylated substances. *Int J Androl* 31(2): 161-9.
- Kulle, A. E., Riepe, F. G., Melchior, D., Hiort, O., Holterhus, P. M. (2010). A novel ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in pediatric blood samples: age- and sex-specific reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 95(5): 2399-409.
- LANUV (2011). LANUV-Fachbericht 34. Verbreitung von PFT in der Umwelt. Ursachen – Untersuchungsstrategie – Ergebnisse – Maßnahmen. <http://www.lanuv.nrw.de/veroeffentlichungen/fachberichte/fabe34/fabe34start.htm>. Zuletzt abgerufen am:
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci* 99(2): 366-94.
- Lopez-Espinosa, M. J., Fletcher, T., Armstrong, B., Genser, B., Dhatriya, K., Mondal, D., Ducatman, A., Leonardi, G. (2011). Association of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) with age of puberty among children living near a chemical plant. *Environ Sci Technol* 45(19): 8160-6.
- Nolan, L. A., Nolan, J. M., Shofer, F. S., Rodway, N. V., Emmett, E. A. (2009). The relationship between birth weight, gestational age and perfluorooctanoic acid (PFOA)-contaminated public drinking water. *Reprod Toxicol* 27(3-4): 231-8.

- Olsen, G. W., Gilliland, F. D., Burlew, M. M., Burris, J. M., Mandel, J. S., Mandel, J. H. (1998). An epidemiologic investigation of reproductive hormones in men with occupational exposure to perfluorooctanoic acid. *J Occup Environ Med* 40(7): 614-22.
- Olsen, G. W., Logan, P. W., Hansen, K. J., Simpson, C. A., Burris, J. M., Burlew, M. M., Vorarath, P. P., Venkateswarlu, P., Schumpert, J. C., Mandel, J. H. (2003). An occupational exposure assessment of a perfluorooctanesulfonyl fluoride production site: biomonitoring. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J. (Fairfax, Va)* 64(5): 651-9.
- Petersen, A. W., Crockett, L., Richards, M., Boxer, A. (1988). A Self-Report Measure of Pubertal Status: Reliability, Validity, and Initial Norms. *Journal of Youth and Adolescence* 17(No. 2): 117-133.
- Siri, W. E. (1956). The gross composition of the body. *Advances in biological and medical physics* 4: 239-80.
- Skutlarek, D., Exner, M., Farber, H. (2006). Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. *Environ Sci Pollut Res Int* 13(5): 299-307.
- Thomas, L. (2005). *Labor und Diagnose*. Frankfurt/ Main, TH-Books Verlagsgesellschaft.
- Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen (2014). Leistungsverzeichnis des Hormonlabors der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen. Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Pädiatrische Endokrinologie. <http://www.medizin.uni-tuebingen.de/kinderklinik/de/laborleistungen/hormonlabor/leistungsverzeichnis-hormonlabor-2014.pdf>. Zuletzt abgerufen am: 16.05.2014.
- van Helden, J., Roelofs, S., Darte, C., Artus, A. (2011). Pediatric thyroid reference intervals tanner stage- or age-stratified on a German population. *CLINICAL BIOCHEMISTRY* 44(7): 522.
- Watzlawik, M. (2009). Die Erfassung des Pubertätsstatus anhand der Pubertal Development Scale. *Diagnostica* 55(1): 55-65.

