

Abschlussbericht

F+E-Vorhaben 206 67 448/05

Bewertung und Regulation von Umwelthormonen

Teilvorhaben 5:
Entwicklung struktur- und risikobasierter Methoden zur Identifizierung
von Chemikalien mit Verdacht auf endokrine Wirkungen zur Priorisierung
für das Zulassungsverfahren unter REACH

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie
und Angewandte Ökologie (Fraunhofer IME)
57392 Schmallenberg

Fraunhofer-Institut für Toxikologie
und Experimentelle Medizin (Fraunhofer ITEM)
30625 Hannover

Analytisches Laboratorium für Umweltuntersuchungen
und Auftragsforschung
24816 Luhnstedt

Schmallenberg, den 21. April 2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZUSAMMENFASSUNG	6
2	GRUPPIERUNG VON STOFFEN AUF DER GRUNDLAGE CHEMISCHER STRUKTURMERKMALE	8
2.1	ÜBERBLICK ÜBER EXISTIERENDE (Q)SAR-MODELLE	8
2.2	ÜBERBLICK ÜBER (KOMMERZIELLE) EXPERTENSYSTEME	9
2.3	AUFBEREITUNG DES KENNTNISSTANDES ÜBER STRUKTURMERKMALE, DIE EINE WECHSELWIRKUNG MIT ÖSTROGEN- ODER ANDROGENREZEPTOREN ERMÖGLICHEN	11
3	ZUSAMMENSTELLUNG VON STOFFEN MIT BEKANNTER ENDOKRINER WIRKUNG UND VON STOFFEN, BEI DENEN EINE ENDOKRINE WIRKUNG MIT HOHER WAHRSCHEINLICHKEIT AUSGESCHLOSSEN IST.	16
3.1	<i>IN VITRO</i> TESTSYSTEME	16
3.2	DATENQUELLEN.....	21
3.3	VERGLEICH DER AKTIVITÄTEN IN REZEPTOR-LIGANDENBINDUNGSTESTS UND TESTS AUF REPORTERGEN-AKTIVIERUNG IN ZELLEN <i>IN VITRO</i>	23
4	UNTERSUCHUNGEN ZU STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNGEN.....	28
4.1	VORBEREITUNG DES DATENSATZES.....	28
4.2	ANWENDBARKEIT VON VORFILTERN	28
4.3	ANWENDBARKEIT BEKANNTER SUBSTRUKTUREN ZUR IDENTIFIZIERUNG POTENZIELL ENDOKRIN WIRKSAMER STOFFE	30
4.4	ENTWICKLUNG EINES PROGRAMMS ZUR DURCHFÜHRUNG SUBSTRUKTUR-BASIERTER SAR-MODELLE	32
4.5	ÜBERPRÜFUNG DER APPLICABILITY DOMAIN MITTELS ACFs.....	33
4.6	ANWENDUNG DER METHODE AUF DEN EINECS-DATENSATZ.....	33
5	GRUPPIERUNG VON STOFFEN AUF DER GRUNDLAGE TOXIKOLOGISCHER WIRKUNGEN	35
5.1	EINLEITUNG.....	35
5.2	DATEN- UND STUDIENANFORDERUNGEN UNTER REACH.....	36
5.3	MÖGLICHE DETEKTION ENDOKRINER UND REPRODUKTIONSTOXISCHER EFFEKTE DURCH STUDIENANFORDERUNGEN UNTER REACH UND PARAMETER ZUR EVALUIERUNG	40
5.4	VERGLEICH SUBSTANZ-SPEZIFISCHER EFFEKTE AUF JUVENILE UND ADULTE ORGANISMEN	44
5.5	VERGLEICH VON SUBSTANZKLASSEN-SPEZIFISCHEN EFFEKTEN ZWISCHEN STUDIEN MIT MEHRFACHAPPLIKATIONEN UND MEHRGENERATIONENSTUDIEN.....	45
5.6	GEWICHTUNG DER BEOBACHTETEN EFFEKTE FÜR IHRE MÖGLICHE RELEVANZ ALS INDIKATOR FÜR ENDOKRINE WIRKUNGEN	46
5.7	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	VERGLEICH VON SUBSTANZ-SPEZIFISCHEN EFFEKTEN <i>IN VITRO</i> / <i>IN VIVO</i> UND IN REPRODUKTIONSTOXIKOLOGISCHEN STUDIEN	51
6.1	DETEKTION ENDOKRINER EFFEKTE IN ÖKOTOXIKOLOGISCHEN STUDIEN MIT FISCHEN.....	51
6.2	VERGLEICH SUBSTANZ-SPEZIFISCHER EFFEKTE DURCH <i>IN VITRO</i> - UND <i>IN VIVO</i> -MODELLE	52

7	INTEGRATION DER CHEMISCHEN UND TOXIKOLOGISCHEN METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON POTENTIELL ER/AR-WIRKSAMEN CHEMIKALIEN	55
7.1	AUSSAGEKRAFT VON CHEMISCHEN UND TOXIKOLOGISCHEN METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON POTENTIELL ER/AR-WIRKSAMEN CHEMIKALIEN.....	55
7.2	VERGLEICHENDE ANALYSE DER (PARTIELLEN) ÜBEREINSTIMMUNG VON CHEMISCHEN UND TOXIKOLOGISCHEN METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON POTENTIELL ER/AR-WIRKSAMEN CHEMIKALIEN	57
7.3	ANWENDUNG DER GRUPPIERUNGSANSÄTZE IN DER PRIORITÄTENSETZUNG	63
8	LITERATURVERZEICHNIS	66
9	ANHANG.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Strukturmerkmale, die als Screening-Kriterien (Vorfilter) für "nicht-EDC" vorgeschlagen wurden	12
Tabelle 2:	Strukturmerkmale, die Wechselwirkungen mit Östrogen- und/oder Androgen-rezeptoren ermöglichen. ER: Bindung an Östrogenrezeptor, AR: Bindung an Androgenrezeptor.....	14
Tabelle 3:	Zusammenstellung der Reportergergen-Testsysteme, mit denen die ausgewerteten Daten erhalten wurden.....	19
Tabelle 4:	Überblick über die DSSTOX-Daten	21
Tabelle 5:	Überblick über die ECB-Daten	21
Tabelle 6:	Anzahl Substanzen, für die in der Literatur Daten gefunden wurden	22
Tabelle 7:	Anteil der gemeinsamen Datensätze aus Ligandenbindungstests und Reportergergen-Tests	23
Tabelle 8:	Vergleich der FDA-Ligandenbindungstests (EDKB FDA, n=202) mit Reportergergen-Tests (Zelltests) auf androgene und antiandrogene Aktivität	23
Tabelle 9:	Vergleich der Ligandenbindungstests aus Literaturrecherchen (n=37) mit Reportergergen-Aktivierungstests (Zelltests) auf androgene und antiandrogene Aktivität.....	24
Tabelle 10:	Vergleich der FDA-Ligandenbindungstests (EDKB FDA, n=231) mit Reportergergen-Aktivierungstests (Zelltests) auf östrogene Aktivität.....	25
Tabelle 11:	Vergleich der ER _{alpha} und ER _{beta} Ligandenbindungstests aus der Literatur (n=261 bzw. 29) mit ER _{alpha} und ER _{beta} Reportergergen-Tests (Zelltests) auf östrogene Aktivität.....	26
Tabelle 12:	Vergleich der ER _{alpha} Ligandenbindungstests aus der Literatur (n=261) mit ER _{alpha} Reportergergen-Tests (Zelltests) auf antiöstrogene Aktivität.....	26
Tabelle 13:	Anwendbarkeit von Vorfiltern.....	29
Tabelle 14:	Anwendbarkeit von Substrukturindikatoren für die Erkennung "aktiver" Substanzen	31
Tabelle 15:	Unter REACH in der Toxikologie erhobene Daten in Abhängigkeit von der Produktionsmenge	36

Tabelle 16:	Vereinfachte Zusammenfassung der in OECD Guideline Studien erhobenen reproduktionstoxikologischen Parameter, welche durch endokrine Wirkungen beeinflusst werden können	39
Tabelle 17:	Zusammenfassung der erhobenen reproduktionstoxikologischen/endokrinen Parameter in Abhängigkeit von der jährlichen Tonnage einer Substanz unter REACH.....	41
Tabelle 18:	Beeinflussung reproduktionsbiologischer Parameter durch reproduktionstoxische Substanzen ohne endokrine Wirkung sowie durch endokrin wirkender Substanzen mit den Zielstrukturen Östrogenrezeptor, Androgenrezeptor, Aromatase, 5- α -Reduktase und Schilddrüse.....	43
Tabelle 19:	Vergleich der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Daten der Substanzen, für die Ergebnisse aus Fisch Studien vorliegen (FFLC oder FSA)	53
Tabelle 20:	Detailergebnisse des paarweisen Vergleichs der <i>in vitro</i> und <i>in silico</i> Befunde (n = 744)	59
Tabelle 21:	Fehlerquoten des klassenweisen Vergleichs der <i>in vitro</i> und <i>in silico</i> Befunde (n = 744)	59
Tabelle 22:	Detailergebnisse des paarweisen Vergleichs der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Befunde (n = 51)	60
Tabelle 23:	Detailergebnisse des paarweisen Vergleichs der <i>in vivo</i> und <i>in silico</i> Befunde (n = 51)	60
Tabelle 24:	Detailergebnisse des paarweisen Vergleichs der <i>in vivo</i> und <i>in silico</i> Befunde (n = 240)	61
Tabelle 25:	Übersicht der Übereinstimmungen von chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätzen.....	61
Tabelle 26:	Vergleich der <i>in vitro</i> und <i>in silico</i> Klassifizierungen unter Berücksichtigung der <i>in vivo</i> Befunde (n = 933)	62
Tabelle 27:	(Q)SAR-Modelle, die die Wechselwirkung mit Östrogenrezeptoren modellieren	78
Tabelle 28:	(Q)SAR-Modelle, die die Wechselwirkung mit Androgenrezeptoren modellieren	80
Tabelle 29:	Strukturmerkmale, die eine Wechselwirkung mit Östrogenrezeptoren ermöglichen. M _G : Strukturmerkmal "Grundgerüst", M _S : Strukturmerkmal "Substruktur"	81
Tabelle 30:	Strukturmerkmale, die eine Wechselwirkung mit Androgenrezeptoren ermöglichen. M _G : Strukturmerkmal "Grundgerüst", M _S : Strukturmerkmal "Substruktur"	93
Tabelle 31:	Falsch-negativ erkannte Stoffe, die als "aktiv" charakterisiert wurden. (1 = hohe Aktivität, 5 = keine oder sehr schwache Aktivität)	100
Tabelle 32:	Modellsubstanzen zur Evaluierung endokriner Effekte	102
Tabelle 33:	15 Substanzen zur Parameterevaluierung endokriner Effekte mit vermuteter endokriner Wirkung oder unbekanntem Wirkmechanismus sowie 15 Substanzen mit reproduktionstoxischen Effekten nicht aber endokriner Wirkung (Negativkontrollen)	104
Tabelle 34:	Gegenüberstellung der beobachteten Effekte endokriner Substanzen mit bekanntem Wirkmechanismus, endokrin wirksamer Substanzen ohne gesicherten Wirkmechanismus und bekannter reproduktionstoxischer	

	Substanzen ohne endokrine Wirkung an Hand der in OECD Guideline Studien erhobenen Parameter	106
Tabelle 35:	Effekte einer Exposition von Ratten gegenüber der endokrin wirksamen Substanz Vinclozolin in Abhängigkeit von Expositionsszenario, Lebensphase und Geschlecht ^{130,134} . Effekte mit Abhängigkeit zum Expositionszeitraum wurden farblich unterlegt. Abkürzungen: ↑: Zunahme; ↓: Abnahme; Δ: Veränderung	115
Tabelle 36:	Vergleich der LOEL (Lowest Observed Effect Level) für die Gesamtoxizität (oLOEL) und Effekte auf die Hoden und Spermienproduktion in Repeated-Dose-Studien und Multigenerationsstudien	116
Tabelle 37:	Beispiele für Struktur-abhängige schädigende Effekte an Hand der Gruppe der Phthalate.....	117
Tabelle 38:	Vergleich von <i>in vivo</i> Effekten ausgewählter Modellsubstanzen in Säugetier- und Fischtellungen.....	118
Tabelle 39:	Vergleich von <i>in vivo</i> Effekten ausgewählter Modellsubstanzen in Säugetiertestungen mit Effekten aus <i>in vitro</i> Testungen.....	119
Tabelle 40:	Definition der Kandidaten für structural alerts.....	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema zur möglichen Unterscheidung zwischen allgemeinen reproduktions-toxischen Effekten und Eingriffen in das endokrine System	47
--------------	--	----

1 Einleitung und Zusammenfassung

Die Neuregulierung des europäischen Chemikalienrechts durch die Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (**REACH-VO**) stellt das Vorsorgeprinzip für Mensch und Umwelt hinsichtlich besonders besorgniserregender Stoffe stärker in den Vordergrund ¹. Stoffe mit (sehr) persistenten, (sehr) bioakkumulierenden und toxischen Eigenschaften (**PBT- und vPvB-Stoffe**), karzinogene, mutagene und reproduktionstoxische Substanzen (**CMR-Stoffe**), sowie Chemikalien, die in Einzelfallentscheidungen als besonders besorgniserregend identifiziert werden (z.B. **Stoffe mit endokriner Wirkung**), können zukünftig zulassungspflichtig werden.

Endokrine Wirkungen von Umweltchemikalien bedürfen einer besonderen Teststrategie, da sie mit den Endpunkten in Standardtests nur unzureichend oder gar nicht erfasst werden ². Während über die Testverfahren für den aquatischen Bereich inzwischen weitgehend Einvernehmen besteht und die Endpunktauswahl fortgeschritten ist, ist es weiterhin notwendig Strategien zu entwickeln, um anhand von vorhandenen Informationen Stoffe zu identifizieren die möglicherweise endokrine Eigenschaften haben könnten. Hier bieten sich vor allem zwei Möglichkeiten an, deren Kombination den erfolgversprechendsten Ansatz ergibt:

- Die Nutzung aller bestehenden Informationen bezüglich potenziell endokriner Wirkungen, insbesondere auch solcher Daten, die im Rahmen (human)toxikologischer Untersuchungen am Säuger erarbeitet wurden.
- Die Nutzung struktureller Molekülinformationen zur Vorhersage potenzieller endokriner Wirkungen mit Hilfe Quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR).

Beide Ansätze wurden in dem F&E-Vorhaben berücksichtigt. Ziel des Vorhaben war es ein Screeninginstrument zu entwickeln welches die Möglichkeit gibt, anhand von vorhandenen Informationen Stoffe zu identifizieren die möglicherweise endokrin aktiv sein könnten. Der Schwerpunkt liegt dabei auf dem Herausfiltern von Stoffen, die mit größter Wahrscheinlichkeit ein endokrines Potential besitzen, und die im weiteren Vorgehen intensiver betrachtet werden sollen. Die eindeutige Identifizierung eines Stoffes als endokriner Disruptor ist anhand des Screeninginstrumentes nicht möglich und auch nicht angestrebt. Die Identifizierung einer Substanz mit dem Screeninginstrument als potentiell endokrin dient nicht der Einstufung des Stoffes als "besonders besorgniserregend" im Sinne der REACH Verordnung.

Im vorliegenden Bericht wird zunächst in Kapitel 2 ein Überblick über schon existierende (Q)SAR-Modelle und über bekannte Strukturmerkmale gegeben, die zur Identifizierung möglicher endokrin wirksamer Stoffe herangezogen werden können. Die Bezeichnung "endokrin wirksam" bezieht sich in diesem Vorhaben auf das sexualendokrine System, speziell auf Östrogen- und Androgenrezeptor-vermittelte Wirkungen.

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit von Strukturmerkmalen für die Erkennung endokrin wirksamer Stoffe wird ein Datensatz von Stoffen mit bekannter endokriner Wirkung (bzw. Nicht-Wirksamkeit) benötigt. Es wurden Recherchen zu Stoffen durchgeführt, für die Daten aus *in vitro* Tests über östrogene, androgene bzw. antiestrogene oder antiandrogene Wirkung vorlagen. Die Testsysteme und die Datenbasis werden in Kapitel 3 beschrieben.

Auf der Basis schon bekannter Strukturmerkmale und anhand des aus Kapitel 3 vorliegenden Datensatzes wurde ein Modell entwickelt, das zur Erkennung potentiell endokrin wirk-

samer Stoffe herangezogen werden kann. Die Vorgehensweise, das zur Durchführung genutzte Software-System und die Anwendung des Modells auf den EINECS-Datensatz werden in Kapitel 4 beschrieben.

In Kapitel 5 und 5.5 werden Möglichkeiten zur Identifizierung potentiell endokrin wirksamer Stoffe an Hand von Befunden aus (human)toxikologischen Untersuchungen am Säuger aufgezeigt. Daten aus Langzeitstudien mit Mehrfachapplikation und reproduktionstoxikologischen Studien bieten Hinweise auf endokrine Störungen; als Parameter mit besonderer Aussagekraft wurden identifiziert:

- Fehlbildungen der Reproduktionsorgane,
- Fehlbildungen und Variationen der sekundären Geschlechtsmerkmale,
- Veränderungen der Serumhormonkonzentration.

In Kapitel 6 werden die Befunde aus den reproduktionstoxikologischen Studien an Säugern mit Ergebnissen aus *in vivo* Studien mit Fischen und den *in vitro* Daten verglichen.

In Kapitel 7 werden Möglichkeiten der Integration chemischer und toxikologischer Gruppierungsansätze unter Berücksichtigung der jeweiligen Aussagekraft und Anwendungsdomänen beschrieben. Die komplementären Informationen erlauben eine kombinierte Methodik sowohl für die Priorisierung sexualendokrin wirksamer Stoffe als auch für die Identifizierung von weiteren Verdachtsstoffen.

2 Gruppierung von Stoffen auf der Grundlage chemischer Strukturmerkmale

2.1 Überblick über existierende (Q)SAR-Modelle

Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSARs) bieten erhebliche Möglichkeiten zur Abschätzung von Eigenschaften und Wirkungen von Chemikalien aus ihrer Struktur. Dabei sind Verfahren zur Diskriminierung aktiver und nicht-aktiver Stoffe (z.B. endokrine Wirkungen ja/nein) und Modelle zur Abschätzung von Wirkstärken (z.B. EC₅₀ für die Interaktion mit Rezeptoren) möglich. Endokrin wirksame Substanzen weisen eine erhebliche strukturelle Diversität auf, die in Abhängigkeit von den zugrundeliegenden Rezeptorinteraktionen (Östrogen/Androgen, Agonist/Antagonist) variieren kann. Die Kombination verschiedener qualitativer Verfahren und quantitativer Modelle wird derzeit als notwendig erachtet, um endokrine Wirkungen mit dem Ziel der Prioritätensetzung zuverlässig abzuschätzen.

Die meisten QSAR-Modelle und Klassifizierungsverfahren beschreiben, entsprechend den derzeit gebräuchlichen experimentellen Screening-Verfahren (Ligandenbindungstests), keine Wirkungen, sondern Bindungsstärken am jeweiligen Rezeptor (% RBA: relative binding affinity). Dies ist in zweierlei Hinsicht einschränkend: (1) Die Bindung an den Rezeptor ist zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die Auslösung endokriner Effekte und stellt nur einen unter mehreren möglichen multiplen Mechanismen dar. (2) Eine Unterscheidung von Agonisten und Antagonisten mittels Strukturmerkmalen ist auf dieser Basis nicht möglich. Die große strukturelle Ähnlichkeit von, z.B., Östrogenrezeptoragonisten und -antagonisten verdeutlicht eine chemometrische Profilanalyse³. Die Tendenz, dass Antagonisten stärker "bulky" sind, daher möglicherweise mit weiteren Stellen im Rezeptor interagieren und dadurch die Quartärstruktur von Proteinen verändern, ist bisher nicht in prädiktive Modelle fassbar⁴.

Detaillierte Informationen über einige (Q)SAR-Modelle sind in Tabelle 27 und Tabelle 28 im Anhang aufgeführt. Vornehmlich zur Bindung an Östrogenrezeptoren wurden QSARs für diverse Substanzklassen mit unterschiedlichen Techniken von einfacher Regression bis zu komplexen Klassifizierungen beschrieben (Reviews z.B. ⁵⁻⁸). Ein Vergleich zeigt, dass viele (Q)SAR-Modelle die Hydrophobie (z.T. als log K_{OW}) bzw. die Molekülgröße (z.B. als Molekulargewicht) in Verbindung mit Substrukturelementen (z.B. phenolische Ringstruktur, topologische Indizes) zur Beschreibung der Rezeptoraffinitäten verwenden. Damit liefern diese (Q)SAR-Modelle eine gute Basis zur Identifizierung von Strukturmerkmalen in Substanzen, die potentielle ER/AR-Liganden sind (siehe Kapitel 2.3).

Sterische und elektrostatische Interaktionen von Liganden mit Rezeptoren können *in silico* mit 3-dimensionalen QSAR-Techniken, z.B. CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis), untersucht werden^{7,9,10}. Der für CERI (Japan) entwickelte Prototyp ADAM (Automatic Docking Method) simuliert Rezeptorbindungen unter Berücksichtigung flexibler Konformationen¹¹. Voraussetzung sind Kenntnisse der Struktur und Konformation sowohl des jeweiligen Rezeptors als auch der Chemikalie im biologischen Medium. Aufgrund des großen Einflusses der subjektiven 3-dimensionalen Optimierung und Ausrichtung von

Molekülen am Rezeptor ist CoMFA zum automatischen Screening großer Datensätze bisher nicht einsetzbar.

COREPA (common reactivity pattern) berücksichtigt verschiedene Konformationen flexibler Moleküle¹². Deskriptorprofile ihrer Reaktivitäten und Wasserstoffbrückenbindungen werden genutzt um die Bindung an Rezeptoren abzuschätzen^{4,13,14}. Die Methode ist bisher nur innerhalb von Stoffklassen zuverlässig anwendbar.

Das 4-stufige Modell der U.S. EPA zur Priorisierung endokrin wirksamer Substanzen^{7,8,15} beginnt mit einfachen Filtern (Molekulargewicht, Ringstrukturen), gefolgt von Zuordnungen durch parallele QSAR-Modelle auf der Basis von 2-D Strukturen und/oder Klassifizierungsmodellen der Ähnlichkeit von Molekülen⁹. Die 3. Stufe umfasst quantitative Abschätzungen mittels CoMFA. Zur abschließenden Prioritätensetzung werden die Ergebnisse der Stufen 1-3 relativ zu Produktionsvolumen, Freisetzung, Exposition, etc. bewertet. Die steigende Komplexität der Methode minimiert falsch-negative Vorhersagen¹⁶. Die Kombination heterogener Entscheidungsbäume zu Entscheidungswäldern soll die Anwendungsdomäne für unterschiedliche Substanzklassen verbessern¹⁷.

2.2 Überblick über (kommerzielle) Expertensysteme

Expertensysteme stellen zumeist automatisierte Plattformen für die Abschätzung von Chemikalieneigenschaften dar. Viele kommerzielle Systeme zeichnen sich durch sehr hohe Kosten aus, ein Einsatz solcher Programme war im Rahmen dieses Vorhabens nicht möglich.

Expertensysteme können eingeteilt werden nach:

- a) der Art und Weise der Modellerstellung (statistisch, regel-basiert, wissens-basiert),
- b) nach Art der Darstellung untersuchter chemischer Strukturen: Modelle, die auf zweidimensionalen Strukturen basieren und solche, die dreidimensionale Strukturen betrachten,
- c) ferner unterscheiden sich Expertensysteme darin, ob die Nutzer neue Modelle entwickeln, neue Modelle nur hinzu fügen, oder gar keine Änderung am System vornehmen können.

Regel-basierte Modelle sind auf der Basis automatisierter Regelerkennungen (Mustererkennung, andere statistische Verfahren) aufgebaut. Ihr Vorteil besteht darin, dass die abgeleiteten Regeln statistisch abgesichert sind. Andererseits besteht häufig der Nachteil, dass ein mechanistisches Verständnis für die abgeleiteten Regeln fehlt ("black-box-Modell").

Beispiele für regel-basierte Expertensystem sind:

- TOPKAT (<http://www.accelrys.com/products/topkat/>) ist ein geschlossenes System, das nur die vom Hersteller angebotenen Modelle enthält. TOPKAT berücksichtigt nur Parameter, die aus der zwei-dimensionalen Struktur abgeleitet werden können. TOPKAT enthält keine Modelle für den Endpunkt "endokrine Wirkung".
- Multicase (<http://www.multicase.com/>) berücksichtigt im Gegensatz zu TOPKAT auch einige Parameter, die sich auf die dreidimensionale Struktur beziehen. Multicase ermöglicht auch die Entwicklung und Nutzung eigener Modelle. Multicase enthält ein Modell zur Erkennung von Substanzen mit Bindungspotential für den östrogenen Rezeptor ^{18,19}.
- OASIS (<http://btu6.btu.bg/>) bietet sowohl existierende Modelle als auch die Möglichkeit zur Modellentwicklung auf der Basis drei-dimensionaler Molekülparameter. OASIS enthält ein Modul zu endokrinen Wirkungen ²⁰.
- ADMEWorks / ModelBuilder (http://www.fqs.pl/pl/life_science/admeworks_modelbuilder/overview) bietet mit seiner ModelBuilder-Komponente ein leistungsstarkes Tool zur Entwicklung von QSAR-Modellen. Es können Modelle auf der Basis von zwei- oder drei-dimensionalen Strukturen entwickelt werden. Die ADMEWorks-Komponente bietet dagegen schon entwickelte Modelle an. ADMEWorks enthält aber keine Modelle zum Endpunkt "endokrine Wirkung".
- OECD (Q)SAR Application Toolbox (<http://www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar>) ist frei verfügbar und bietet umfangreiche Verfahren zur Kategorisierung von Chemikalien. Die Version 1.0 enthält noch keinen Profiler für "endokrine Wirkung".
- Propertest in Kombination mit weiteren QSAR-Tools des Fraunhofer IME ²¹⁻²³ bietet Programme zur Berechnung von 2D- und 3D-Molekülparametern, die für die Entwicklung von QSAR-Modellen genutzt werden können. Propertest dient in diesem Vorhaben als Basis zur Implementierung eines Programms zur Durchführung Substruktur-basierter SAR-Modelle zum Endpunkt "endokrine Wirkung".

Als ein Beispiel für ein wissens-basiertes Expertensystem kann das Programm DEREK genannt werden. Wissens-basierte Systeme werden aufgrund der Erfahrung von Spezialisten erstellt und es liegt in der Regel keine statistische Ableitung der Modelle vor. DEREK bietet keine Modelle zum Endpunkt "endokrine Wirkung" an.

(http://www.lhasalimited.org/index.php?cat=2&sub_cat=64)

2.3 Aufbereitung des Kenntnisstandes über Strukturmerkmale, die eine Wechselwirkung mit Östrogen- oder Androgenrezeptoren ermöglichen

Die Gruppierung von Stoffen als potentielle Liganden von Östrogen- oder Androgen-Rezeptoren berücksichtigt drei wesentliche Aspekte:

- Grundgerüste, die "steric fit" am Rezeptor bedingen,
- Substrukturen, die für lokale Wechselwirkungen mit Bindungsstellen im Rezeptor verantwortlich sind,
- physiko-chemische Eigenschaften, die Bindungsstärken am Rezeptor bestimmen, modulieren oder abbilden können.

Für chemisch analoge Stoffklassen, die anhand ihrer Grundgerüste identifiziert werden, können deren relative Rezeptorbindungsstärken durch weitere (kleinere) Substrukturen und physiko-chemische Eigenschaften beschrieben werden. Die entsprechenden QSAR-Modelle sind spezifisch für diese Substanzklassen. Substruktur-basierte Modelle für einen breiteren Anwendungsbereich verwenden zumeist mehrere charakteristische (kleinere) Bausteine, z.B. phenolische OH-Gruppen mit definiertem Substitutionsmuster des aromatischen Rings^{9,18,19,24-26}. Als Modulatoren der Rezeptorbindungsaffinitäten dienen weitere Substrukturen und verschiedene physiko-chemische, z.B. sterische und elektronische, Eigenschaften.

Strukturmerkmale, die gemäß Literaturrecherche eine Wechselwirkung mit Östrogen- und/oder Androgenrezeptoren ermöglichen, sind in Tabelle 29 und Tabelle 30 (im Anhang) zusammengestellt. Aus den (Q)SAR-Modellen (Tabelle 27 und Tabelle 28) wurden zunächst anhand der untersuchten Stoffklassen und der verwendeten Deskriptoren gemeinsame Strukturelemente extrahiert. Von einer Unterscheidung von jeweiligen Agonisten und Antagonisten wurde abgesehen, da unterstellt werden kann, dass beide Arten von Rezeptorinteraktionen zu unerwünschten Wirkungen von Umweltchemikalien führen können.

Bemerkenswert ist, dass es nur vier bis fünf Datensätze gibt, die von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen Methoden auf charakteristische Strukturmerkmale untersucht wurden. Zur östrogenen Aktivität wurden zumeist verwendet:

- NCTR (National Center for Toxicological Research) (n = 232, davon 129 aktive und 103 inaktive Stoffe; Substanzklassen: 33 Steroide, 22 DESs, 47 Phytoöstrogene, 31 DDTs, 12 PCBs, 32 Alkylphenole, 8 Phthalate, 15 Pestizide und 32 "Andere"), *in vitro* RBA % (Relative Binding Activity in Rezeptorbindungs Studien)²⁷,
- Diverse Strukturen (n = 188), *in vitro* RBA % (Relative Binding Activity in Rezeptor-Bindungs Studien)²⁴ (hierbei handelt es sich offensichtlich um einen Vorläufer der NCTR-Datenbasis),
- Aromaten (n = 120, davon 81 aktive, 36 inaktive und 3 ohne EC₅₀-Wert; Stoffklassen: Bisphenole, Benzophenone, Flavonoide, Biphenyle, Phenole und andere Mono-, Bi-Aromaten), *in vitro* E-Screen (Zelltest: Reporter-gen-Assay)²⁶.

Zur androgenen Aktivität wurden verwendet:

- Diverse Strukturen (n = 202, davon 146 aktive und 56 inaktive Stoffe; Substanzklassen: 54 Steroide, 11 DESs, 17 Phytoöstrogene, 19 Phenole, 9 Flutamide, 18 Diphenylmethane, 6 PCBs, 7 Phthalate und 61 "Andere"), *in vitro* AR-Protein binding affinity²⁸,
- Speed (n = 66, davon 52 aktive und 14 inaktive Stoffe; Substanzklassen: 2 Steroide, 11 DDTs und Bisphenole, 5 Diphenylether, 4 Benzophenone, 7 Phenole, 5 Phthalate, 7 PAKs, 17 Organochlorverbindungen und 8 "Andere"), *in vitro* Reporteragen-Assay²⁹.

Die in Tabelle 29 und Tabelle 30 (im Anhang) zusammengestellten Strukturmerkmale können zwei grundsätzlichen Anwendungen dienen:

- Grundgerüste und Substrukturen zur Erkennung aktiver Stoffe,
- Filterkriterien zur Identifizierung inaktiver Stoffe.

Strukturmerkmale, die als Vorfilter zum Aussortieren von inaktiven Stoffen ("nicht-EDC") vorgeschlagen wurden (Tabelle 1), können ein wichtiger erster Schritt im Screening großer Datenbasen für die Prioritätensetzung sein. Bei Kombination geeigneter Kriterien könnte deren Effizienz im Bereich von 20-30 % liegen⁹. Voraussetzung ist, dass keine falsch-negativen Treffer erzielt werden, d.h. keine tatsächlichen EDC eliminiert werden. In Tabelle 1 sind publizierte Screening-Kriterien (Vorfilter) zusammengestellt.

Tabelle 1: Strukturmerkmale, die als Screening-Kriterien (Vorfilter) für "nicht-EDC" vorgeschlagen wurden

Strukturmerkmal	Beschreibung	Ref.
MW < 94 oder MW > 1000	MW 94 (=Phenol) entspricht dem kleinsten möglichen ER-Binder	Tong et al., Hong et al., Shi et al. ^{7,9,15}
Σ aromat. -OH = 0	keine Ringstruktur mit Wasserstoffbrückenbindungs-donatoren	Hong et al., Gallegos Saliner et al., Netzeva et al. ^{8,30,31}
log K_{ow} < 4,655 <u>wenn kein</u> phenol. -OH log K_{ow} < 1,485 <u>wenn</u> phenol. -OH	Lipophilie	Hong et al. ⁸

Das Filterkriterium "Molekulargewicht" wurde anhand der NCTR-Datenbasis abgeleitet^{7,9,15}. Die untere Grenze (MW < 94) wird von den Autoren damit begründet, dass Phenol der kleinste mögliche ER-Binder sei. Die obere Grenze (MW > 1000) ist nicht durch explizite Strukturen hinterlegt und reflektiert vermutlich die sehr geringe Anzahl von Stoffen mit so hohem Molekulargewicht.

Das Filterkriterium "phenolische Ringstruktur" stellt eine Kombination von Angaben dar, die einerseits anhand der NCTR-Datenbasis die Notwendigkeit einer Ringstruktur für die Bindung an den ER-Rezeptor betonen⁸ und andererseits nur bei Anwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungs-donatoren eine östrogene Wirkung beobachteten^{30,31}. Die Bedeutung

von Wasserstoffbrückenbindungen, nachgeordnetet moduliert von der Lipophilie der Stoffe, wurde anhand des Aromaten-Datensatzes ²⁶ festgestellt.

Das Filterkriterium "Lipophilie" greift den bereits genannten Aspekt der Notwendigkeit einer phenolischen Ringstruktur wieder auf und ergänzt dieses Kriterium um den differenzierenden Faktor "Lipophilie". Ebenfalls anhand des NCTR-Datensatzes abgeleitet, widerspricht dieses Kriterium allerdings dem Vorfilter "phenolische Ringstruktur" insofern, als auch Nicht-Phenole mit sehr hoher Lipophilie als "aktiv" klassifiziert werden.

Eine Überprüfung der Wirksamkeit der Vorfilterkriterien erfolgte anhand des für dieses Vorhaben zusammengestellten Datensatzes von Stoffen mit bekannter endokriner Wirkung und von Stoffen, bei denen eine endokrine Wirkung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen ist. Die im Kapitel 4.2 detailliert dargestellten Ergebnisse zeigen, dass diese Vorfilter die Voraussetzung "keine falsch-negativen Treffer" nicht zuverlässig erfüllen und wenig effizient sind (eliminieren ~ 10 % der inaktiven Stoffe).

Für die Prioritätensetzung im Bereich potentiell endokrin wirksamer Chemikalien sind Grundgerüste und Substrukturen zur Erkennung aktiver Stoffe die wichtigsten *in silico* Werkzeuge. Regelmäßig in vielen Studien identifiziert werden:

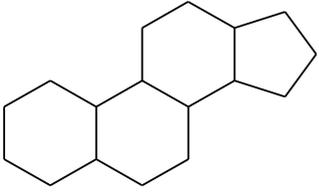
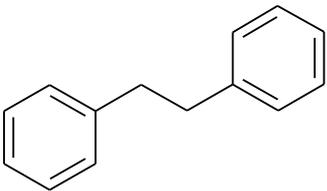
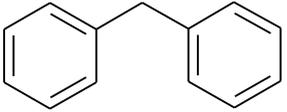
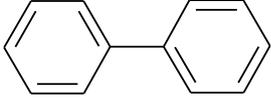
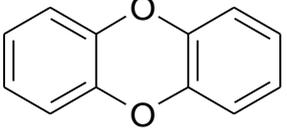
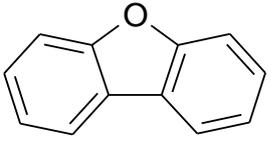
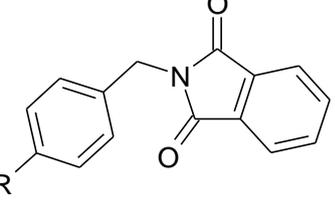
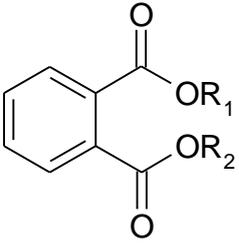
- Steroide,
- DESs,
- Phytoöstrogene,
- Diphenylmethane,
- Biphenyle,
- Phenole.

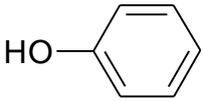
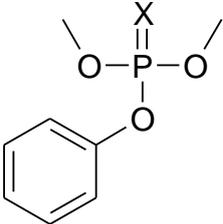
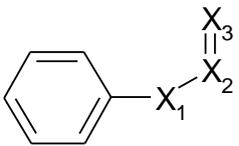
Insgesamt sind die Befunde recht einheitlich, was u.a. daran liegt, dass sämtliche publizierten systematischen Studien zur Analyse und Bewertung von Strukturmerkmalen (Structural Alerts) zur Identifizierung von östrogen/androgen wirksamen Substanzen auf *in vitro* Daten (i.a. Rezeptorbindungstests, Reportergergen-Tests) basieren. Daraus ergibt sich zwangsläufig eine Einschränkung dieses Inventars: Die Strukturmerkmale beziehen sich nur auf die Untergruppe der sexualendokrin-wirksamen Substanzen, deren Wirkung durch kompetitive Interaktion mit ER/AR-Rezeptoren vermittelt wird. Andere endokrine Wirkungen werden nicht erfasst.

Tabelle 29 und Tabelle 30 (im Anhang) verdeutlichen eindrucksvoll die große Ähnlichkeit von Östrogen- und Androgenrezeptoren bezüglich ihrer Bindungsstellen. Nur wenige Substanzklassen interagieren nur mit einer dieser Rezeptorfamilien, z.B. Phthalate. Weil aber unterstellt werden kann, dass jede Bindung von Xenobiotika an Östrogen- und/oder Androgenrezeptoren unerwünscht ist und mögliche Wirkungen nicht ausgeschlossen werden können, erscheint es sinnvoll die Erkenntnisse zu beiden Rezeptortypen zusammenzufassen und gemeinsame Strukturmerkmale zu extrahieren, die im Sinne einer Prioritätensetzung zum Screening auf potentiell endokrin wirksame Substanzen dienen können. Die in Tabelle 2 aufgeführten Strukturmerkmale sind als Indiz zu verstehen, dass entsprechende Stoffe potentielle Liganden von Östrogen- und/oder Androgenrezeptoren sein können, Aussagen zu möglichen Wirkungen sind auf dieser Basis nicht möglich. Substrukturen, die eine Bindung am Rezeptor verhindern könnten (Biophobes ¹⁹), sind grundsätzlich vorstellbar aber weder

mechanistisch noch statistisch so gut abgesichert, dass sie als zuverlässige Screening-Kriterien eingesetzt werden können.

Tabelle 2: Strukturmerkmale, die Wechselwirkungen mit Östrogen- und/oder Androgenrezeptoren ermöglichen. ER: Bindung an Östrogenrezeptor, AR: Bindung an Androgenrezeptor

Strukturmerkmal	Beschreibung	ER	AR
	Steroid-Grundgerüst jede Art von Bindung	▼	▼
	DES-Grundgerüst (auch die meisten Phytoöstrogene) Brücke: C-C (Doppelbindung möglich) oder O-C (Phytoöstrogene), Substitution erlaubt A-Ring: p-OH (eher ER), p-Keto (eher AR) Ring-Subst.: meist para, nicht weiter definiert	▼	▼
	Diphenylmethane (z.B. Bisphenole, Benzophenone, DDTs) diverse Substituenten, Bindungen an C-Brücke und Phenolringen erlaubt Brücke kann C, O, S sein	▼	▼
	Biphenyle (z.B. PCBs) Cl-, OH-Substitution erlaubt 4-OH erforderlich für Bindung	▼	▼
	Dibenzodioxine	▼	?
	Dibenzofurane	▼	?
	Isoindole	?	▼
	Phthalate	neg.	▼

Strukturmerkmal	Beschreibung	ER	AR
	Phenole diverse Cl- oder Alkyl-, Alkoxy-substitution erlaubt, ortho: nur OH-, Cl-Substitution	▼	▼
	Aromat. Phosphorsäureester	?	▼
	Flutamide X ₁ : N, O, C, X ₂ =X ₃ : C=O, P=S, am Ring: 1 bis 2 m-, p-Substituenten	?	▼

Die auf der Basis von *in vitro* Daten identifizierten für ER/AR Aktivierung oder Hemmung charakteristischen Strukturmerkmale werden durch die Ergebnisse von unterschiedlichen *in vivo* Studien grundsätzlich bestätigt, wenn auch aufgrund der komplementären Anwendungsdomänen (siehe Kapitel 7) *in vitro* / *in vivo* Extrapolationen nur eingeschränkt möglich sind und nicht für eine Gewichtung der Relevanz von Strukturmerkmalen herangezogen werden können.

3 Zusammenstellung von Stoffen mit bekannter endokriner Wirkung und von Stoffen, bei denen eine endokrine Wirkung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen ist.

Ein Teilziel des Vorhabens war die Zusammenstellung von Stoffen mit bekannter endokriner Wirkung und von Stoffen, bei denen eine endokrine Wirkung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen ist. Im Rahmen dieses Vorhabens beschränkt sich "endokrine Wirkung" auf die über den Östrogenrezeptor (ER) oder Androgenrezeptor (AR) vermittelten Effekte, die Rezeptor-aktivierend (Agonisten) oder -inhibierend (Antagonisten) sein können. Diese Stofflisten dienen unter anderem der Überprüfung der in Kapitel 2.3 aufgestellten Kriterien. Die Daten wurden in einer MS-Access-Datenbank zusammengefasst. Insgesamt liegen für ca. 840 Stoffe Daten vor. Für ca. 820 Stoffe liegen chemische Strukturen in Form von SMILES-Codes vor und von diesen Substanzen sind ca. 790 rein organische Substanzen (also keine Salze, Anorganika etc.). Nur diese können für SAR-Untersuchungen mittels der oben aufgeführten Substrukturmerkmale verwendet werden.

3.1 *in vitro* Testsysteme

Zur Untersuchung der östrogenen oder androgenen Aktivität von Substanzen stellen die rezeptorbasierten *in vitro* Tests nützliche Systeme dar, da sie die Fähigkeit einer Substanz, mit den ER bzw. AR Rezeptor zu interagieren, messen.

Die Effekte von Östrogenen und Androgenen werden von dem Östrogen bzw. Androgenrezeptor vermittelt, die zu der Superfamilie der nukleären Rezeptoren zählen. Nach Bindung eines Liganden werden die inaktiven Rezeptoren über mehrere Schritte in ihre aktive Form überführt, die an spezifische DNA-Sequenzen bindet und letztendlich zu einer Genaktivierung und Proteinsynthese führt, d.h. zu einer biologischen Antwort.

Es existieren zwei verschiedene Östrogenrezeptor (ER) Formen, die üblicherweise als ER_{alpha} und ER_{beta} bezeichnet werden. Bis 1995 war man der Meinung, dass es nur einen ER-Typ gäbe. Seit 1995 wurden verschiedene Isoformen eines zweiten ER (genannt ER_{beta}) identifiziert. Durch das Vorkommen von ER_{beta} im männlichen Urogenitaltrakt wurde die Diskussion über die Rolle der Östrogene in männlichen Organismen neu belebt.

Jeder Rezeptortyp wird von einem separaten Gen codiert, sie zeigen aber eine große Sequenzhomologie. Beide ER-Typen sind in den verschiedenen Geweben vorhanden, aber es gibt einige bemerkenswerte Unterschiede. ER_{alpha} liegt überwiegend im Endometrium, in Brustkrebszellen, ovarialem Stroma und im Hypothalamus vor. ER_{beta} wurde nachgewiesen in Niere, Hirn, Knochen, Herz, Lunge, Darmmukosa, Prostata und Endothelzellen³².

Die meisten der Testsysteme gehören zu den folgenden drei Kategorien:

1. Kompetitiver Ligandenbindungstest, der die Bindungsaffinität einer Chemikalie an den Rezeptor misst,
2. Reporter-gen-Test, der die durch Rezeptorbindung ausgelöste Aktivität misst (mRNA oder Protein),

3. Zellvermehrungstest, der die durch Rezeptorbindung ausgelöste Zellvermehrung misst.

Die häufigsten Testsysteme, die zur Detektion von östrogenen oder androgenen Aktivität verwendet werden, werden im Folgenden kurz vorgestellt.

3.1.1 Ligandenbindungstests

Die Tests beruhen auf dem primären Wirktyp der Steroide, der Bindung an den Rezeptor. Die Rezeptoren werden aus dem zytosolischen oder nukleären Extrakt von verschiedenen Säugern oder anderen Wirbeltieren gewonnen³³. Die meisten Östrogenbindungstests quantifizieren die Fähigkeit der Testsubstanz mit radioaktiv markiertem Estradiol um die Bindung an den Rezeptor zu konkurrieren. Die Konzentration der Testsubstanz, die die Bindung des markierten Estradiols um 50 % reduziert wird, als IC_{50} bezeichnet (Inhibitory Concentration). Testergebnisse werden als IC_{50} Konzentration angegeben oder als relative Bindungsaffinität (RBA), die sich aus dem Verhältnis der IC_{50} der Testsubstanz zu der IC_{50} des unmarkierten Estradiols ergibt (meist in Prozent). Die Bedeutung dieser Tests liegt in erster Linie in der Charakterisierung einer Substanz als Rezeptorligand. Agonistische oder antagonistische Eigenschaften sowie die Fähigkeit, Transkriptions- und Translationsprozesse auszulösen, können nicht differenziert werden.

3.1.2 Reporter-Tests

Reporter-Tests basieren auf der Fähigkeit einer Substanz durch Rezeptorbindung Transkriptionsprozesse auszulösen. Somit ermöglichen diese Systeme eine integrale Erfassung der molekularen Kaskaden der Rezeptoraktivierung.

Reporter-Tests werden mit genetisch veränderten Vertebratenzellen (meist Säuger) oder Hefezellen durchgeführt. Die Transformation erfolgt durch Einführen von Vektoren mit der entsprechenden Rezeptor DNA-Sequenz zusammen mit dem "Response element", verknüpft mit einem Reporter. Daneben gibt es Zellsysteme mit endogenem Rezeptor (ER: z.B. menschliche Tumorzellen T47D oder MCF-7 Zellen). In Tumorzellen wird meist Luciferase als Reporter (Antwort = Lumineszenz) benutzt, in Hefezellen meist das Enzym β -Galaktosidase (Antwort = Umsetzen eines farbigen Substrates).

In Tests auf aktivierende Wirkung (Agonisten) werden die Zellen direkt exponiert und die Induktion des Reporters kann konzentrationsabhängig bestimmt werden. Die Konzentration der Testsubstanz, die die halbmaximale Induktion des Reporters verursacht, wird als EC_{50} bezeichnet. Die EC_{50} der Testsubstanz wird mit der EC_{50} einer Standardsubstanz (meist 17β -Estradiol oder Testosteron) verglichen und als relative Stärke angegeben.

In Tests auf hemmende Wirkung (Antagonisten) werden die Zellen gleichzeitig mit der Testsubstanz und einer Referenzsubstanz (meist 17β -Estradiol oder [Dihydro-]Testosteron) inkubiert. Die Kontrollzellen erhalten nur die Referenzsubstanz. Die Differenz zwischen den Stärken der Reporterantworten wird als Maß für die antagonistische Aktivität genommen.

Säuger basierte Reportergergen-Test

- CALUX Test System
Der Test benutzt die menschliche Mamma-Adenocarcinoma Zellen T47D mit endogenem Östrogenrezeptor und wurde stabil mit einem Luciferase Reportergergen transfiziert, das drei Östrogen-Response-Elemente (ERE) enthält³⁴⁻³⁶. In neuerer Zeit wurden die Zellen auch stabil mit Androgenrezeptor transfiziert.
- MVLN Zelltest
In diesem Luciferase basierten Testsystem wird ein Derivat der MCF-7 Zellen verwendet (menschliche Mammakarzinoma Zelllinie), die ebenfalls einen endogenen Östrogenrezeptor besitzt^{37,38}.
- Reportergergen-Test mit chimären Rezeptoren
Diese Testsysteme benutzen chimäre Rezeptoren, wie z.B. der E2-Bioassay^{39,40}. Dieser enthält einen chimären Rezeptor (Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors und die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transskriptionsfaktors Gal4) und ein Gal4 reguliertes Reportergergen (Luciferase). Beide Konstrukte wurden in MCF-7 oder HeLa-Zellen transient transfiziert. HGELN sind stabil transfizierte HeLa Zellen⁴¹.

Hefezell basierte Reportergergen-Tests

- Yeast Östrogen Screen (YES assay)
Der rekombinante Hefestamm wurde von GLAXO Inc. (U.K.) entwickelt und Testergebnisse mit Umweltchemikalien zuerst von Routledge und Sumpter⁴² publiziert. In diesem Testsystem wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stabil mit dem menschlichen Östrogenrezeptor transfiziert sowie einem Plasmid, das die EREs und das lac-Z Gen als Reortgergen (β -Galaktosidase) enthält. Der Östrogenrezeptor in dieser Hefe weist im Wesentlichen die gleiche Spezifität auf wie der Forellen Östrogenrezeptor⁴³.

Hefe besitzt eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Systemen, einschließlich der Abwesenheit der endogenen Steroidhormon-Rezeptoren und dem daraus resultierenden Mangel an komplexen Wechselwirkungen zwischen dem ER und andere Rezeptoren⁴². Darüber hinaus, da der ER in die Zelle transfiziert ist, gibt es keine Bedenken über Auswirkungen von Rezeptormutanten oder -varianten, wie in Rezeptor-positiven Zell-Linien, z.B. MCF-7 Zellen^{44,45}. Außerdem wachsen die Hefe-Zellen in einem steroidfreien Medium, wodurch ein niedriger Hintergrundlevel besteht. Ein Nachteil des Tests ist das Vorhandensein der Hefezellwand und aktiver Transportprozesse, die sich möglicherweise von denen der Säugerzellen unterscheiden. Dies kann sich evtl. auf die Aktivität einiger Testsubstanzen auswirken⁴⁶. Auch wird berichtet, dass der YES-Assay nicht alle Antiöstrogene identifizieren kann^{47,48}.

Neben dem GLAXO Stamm existieren noch andere Hefe-basierte Reportergergen-Assays. Darunter befinden sich eine ähnliches System⁴⁹ und ein Hefe zwei-Hybrid-Assay⁵⁰. Doch diese Tests sind empfindlicher gegenüber toxischen Wirkungen der Testsubstanzen als der YES-Assay⁵¹.

3.1.3 Zellvermehrungstests

Die östrogenabhängige Zellvermehrung der menschlichen Brustkrebszelllinie MCF-7 wurde 1976 entdeckt⁵². Soto et al.^{53,54} entwickelten daraus den "E-Screen". In dem Test werden gleiche Zellmengen mit den Testsubstanzen bzw. unbehandeltem Medium inkubiert und die resultierende Zellproliferation nach 4-6 Tagen bestimmt. Antagonisten werden in zwei Schritten identifiziert. Zuerst wird die Fähigkeit der Testsubstanz untersucht, die östrogen-induzierte Proliferation zu hemmen. Danach wird abgesichert, dass es sich um einen Östrogenrezeptor-vermittelten Prozess handelt: ansteigende Östrogenkonzentrationen bei gleichbleibender Testsubstanzkonzentration müssen die Proliferationshemmung wieder aufheben⁵⁵.

Ein gravierender Nachteil des E-Screens ist die mangelnde Östrogenspezifität. Die Zellen reagieren auch auf ca. 20 andere Verbindungen, wie Mitogene, Cytokine, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und andere Hormone⁵⁶. Dadurch kann der E-Screen eher als andere Tests zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Durch zytotoxische Substanzen und andere Wachstumsinhibitoren können falsch-negative Ergebnisse auftreten.

Zusätzlich zu den in den Kapiteln 3.1.2 und 3.1.3 beschriebenen Verfahren wurden die ausgewerteten Daten mit folgenden Reporter-Testsystemen erhalten:

Tabelle 3: Zusammenstellung der Reporter-Testsysteme, mit denen die ausgewerteten Daten erhalten wurden

Kurzbezeichnung	Test Charakteristika	Referenz
Säugerzellen		
AR		
AR-EcoScreen™ cells	Chinesische Hamsteroovarien Zellen (CHO-K1), stabil transformiert mit einem Plasmid, das das AR Response Element enthält, verknüpft mit einem Luciferasegen und der cDNA Sequenz für den Androgenrezeptor.	Araki et al. 2005 ⁵⁷ Satoh et al. 2004 ⁵⁸
hAR-luc CHO cells transiently transformed	CHO Zellen, transient (nicht dauerhaft) cotransfiziert mit dem humanen AR und einem Luciferasevektor.	Vingaard et al. 2000 ⁵⁹ Andersen et al. 2000 ⁶⁰
hAR-luc CV-1 cells transiently transformed	African Green Monkey kidney cells (CV-1), transient cotransfiziert mit humanen AR und einem Luciferasevektor.	Sun et al. 2006, 2007 ^{61,62}
MDA-MB-453 cell proliferation = MDA-kb2	MDA-MB-453 Zellen (Brustkrebszellen) wurden stabil transformiert mit einem Luciferasegen. GR (Glucocorticoid) und AR sind in der Zelle vorhanden. Diese Zelllinie wurde MDA-kb2 genannt.	Wilson et al. 2002 ⁶³ Tamura et al. 2006 ²⁹
PC-3 luc ^{AR+}	Menschliche Prostata Zelllinie (androgen insensitiv) wurde transient cotransfiziert mit hAR und Luciferasegen.	Schrader and Cooke (2002) ⁶⁴

Kurzbezeichnung	Test Charakteristika	Referenz
ER		
E-Screen	siehe Kapitel 3.1.3	Schultis, Metzger 2004 ⁶⁵
HEK293 cells ER-alpha, beta	Mit ER _{alpha} oder ER _{beta} und einem Luciferasegen stabil transfizierte 293HEK Zellen (humane embryonale Niere).	Schreurs et al. 2005 ⁶⁶
MVLN Zellen luc	MVLN-Zellen wurden aus humanen Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen) durch Einfügen eines Luciferase-Reportergens entwickelt (Pons et al. 1990). Zusammen mit dem Reportergen wurden weiterhin ein Promotor und zusätzliche ERE in die DNA der MVLN-Zellen stabil eingefügt. Die Zellen produzieren konstitutiv den humanen Östrogenrezeptor.	Satoh et al. 2004 ⁵⁸
MCF-7 (BUS) ER transactivation	MCF-7 (BUS) Zellen wurden transient cotransfiziert mit Galaktosidase (interner Standard) und ERE-Luciferase (ER aktivierung) Expressionsvektoren.	Andersen et al. 2002 ⁶⁰
MCF-7 transformiert	MCF-7 Zellen wurden transient transfiziert mit dem Gal4-reguliertem Luciferase Reportergen (17m5-G-Luc) and Gal4-ER chimären Rezeptoren, die die D, R, F Domäne des ERs von Mensch, Maus, Huhn, Echse, Xenopus oder Forelle enthalten.	Matthews et al. 2002 ⁶⁷
Hepatozyten, Tilapia Vitellogenin	Primäre Hepatozyten aus männlichen <i>Oreochromis niloticus</i> wurden 44 h exponiert und Vitellogenin in den Hepatozyten wurde mit einem polyclonalem Antikörper in einem nicht-kompetitivem ELISA bestimmt.	Liu et al. 2007 ⁶⁸
Zellvermehrungstest		
T47D cell proliferation	Die ER positive menschliche Brusttumor Zelllinie T47D zeigt verstärkte Proliferation in Gegenwart östrogen aktiver Substanzen.	Nakazawa et al. 2002 ⁶⁹
MCF-7 proliferation	siehe Kapitel 3.1 E-Screen	Andersen et al. 2002 ⁶⁰
Hefezellen		
ER		
Yeast Östrogen Screen (YES), modifiziert zu LYES Assay	siehe Kapitel 3.1. Hier mit zusätzlicher Lyse der Hefen am Testende.	Schultis and Metzger 2004 ⁶⁵
Yeast hER _{alpha} and hER _{beta} bioassay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> wurde stabil mit ER _{alpha} oder ER _{beta} transformiert und dem yeast enhanced green fluorescent protein (yEGFP).	Bovee et al. 2007 ⁷⁰
AR		
Yeast androgen bioassay	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> wurde stabil mit AR transformiert und dem yeast enhanced green fluorescent protein (yEGFP).	Bovee et al. 2007 ⁷⁰

3.2 Datenquellen

Als Datenquelle wurden zunächst ausgewertet:

- 1 NCTRER: National Center for Toxicological Research Östrogen Receptor Binding Database http://www.epa.gov/ncct/dsstox/sdf_nctrer.html

In diesem DSSTOX-Datensatz sind für 232 chemische Substanzen die Rezeptorbindungsaffinitäten angegeben (Ligamentest, Östrogen-Rezeptor – relative binding affinity, Spezies: Ratte) und eine Einteilung in fünf "activity categories" durchgeführt (siehe Tabelle 4). Dieser Datensatz stimmt mit dem weiter unten aufgeführten Datensatz der Endocrine Disruptor Knowledge Base der FDA (EDKB FDA) überein. Für die SAR-Auswertungen wurden die Klassifizierungen des FDA-Datensatzes übernommen, um eine Vergleichbarkeit mit den Klassifizierungen der anderen Datensätze beizubehalten.

Tabelle 4: Überblick über die DSSTOX-Daten

"Activity category"	Kriterium	Anzahl Substanzen
active strong	(ER_RBA > 1),	29
active medium	(1 > ER_RBA > 0.01),	41
active weak	(0.01 > ER_RBA > 1E-5),	61
slight binder	(max < 50% inhibition or ER_RBA < 1E-5)	8
inactive	(no activity, equates with NA designation)	93

- 2 "Endocrine Disrupters"- Daten des ECB

http://ecb.jrc.it/documents/QSAR/QSAR_DATASETS/ENDOCRINE_DISRUPTERS/

Im ECB-Datensatz finden sich 106 chemische Substanzen (unter Berücksichtigung von Isomeren: 110), die in 4 Kategorien eingeteilt sind (Tabelle 5). Die genaue Bedeutung der Kategorien sowie der Ursprung dieser Daten sind unklar, bei der Entwicklung der Modelle werden diese Daten daher nicht mit berücksichtigt.

Tabelle 5: Überblick über die ECB-Daten

Kategorie	"Label and class description"	Anzahl Substanzen
1	E (evidently active)	43
2	P (potentially active)	43
3A and 3B	U (uncertain evidence)	17
3C	N (non active)	3

- 3 Endocrine Disruptor Knowledge Base der FDA (EDKB FDA):

<http://www.fda.gov/nctr/science/centers/toxicoinformatics/edkb/index.htm>

In der EDKB-FAD Datenbank sind sowohl für die Bindung an den Androgen-Rezeptor als auch für die Bindung an den Östrogen-Rezeptor Daten gegeben. Die Daten entstammen Ligandenbindungstests die vom NCTR (National Center for Toxicological Research, Jefferson, USA) validiert und durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Tests sind als Prozent relative Bindungsstärke (RBA) der Substanz im Vergleich zu den entsprechen-

den Positiv-Standards (17R-methyl-³H]methyltrienolone (R1881) für AR und [³H]-17β-Östradiol für ER) angegeben:

- Androgen-Rezeptor (rekombinater Rezeptor): für 146 von 202 Substanzen ist der log (RBA) gegeben, für diese Substanzen liegt der Wert zwischen 2,3 und -3,6. Die restlichen 56 Substanzen sind als nicht-bindend identifiziert worden.
- Östrogen-Rezeptor (aus Ratten Uteri): für 131 von 232 Substanzen ist der log (RBA) gegeben, für diese Substanzen liegt der Wert zwischen 2,6 und -4,5. Die restlichen 101 Substanzen sind als nicht-bindend identifiziert worden.

4 <http://www.scorecard.org/health-effects/>

Diese Liste führt 288 Stoffe auf, die als "Suspected Endocrine Toxicants" bezeichnet werden. Da nicht feststellbar ist, wie diese Stoffliste zustande gekommen ist, und die Liste eine ganze Reihe von Stoffen enthält, die sonst nicht in den üblichen Listen vorkommen (z.B. Ethanol, Chloroform), wurde auf eine Auswertung dieser Liste für den Zweck der Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen verzichtet.

Des Weiteren wurde Primärliteratur ausgewertet; für die in Tabelle 6 aufgeführten Testsysteme wurden Daten recherchiert.

Tabelle 6: Anzahl Substanzen, für die in der Literatur Daten gefunden wurden

Wirktyp	Anzahl Substanzen
<i>Reporter-Tests:</i>	
Androgenrezeptoraktivierung, Agonist	93
Androgenrezeptoraktivierung, Antagonist	395
Östrogenrezeptoraktivierung, Agonist ER alpha	202
Östrogenrezeptoraktivierung, Antagonist ER alpha	86
Östrogenrezeptoraktivierung, Agonist ER beta	62
Östrogenrezeptoraktivierung, Antagonist ER beta	7
<i>Ligandenbindungs-Tests:</i>	
Rezeptorbindung AR	36
Rezeptorbindung ER alpha	246
Rezeptorbindung ER beta	28

ER = Östrogenrezeptor; AR = Androgenrezeptor

Die Daten wurden in einer MS-Access-Datenbank aufgenommen, die dem Umweltbundesamt zur Verfügung gestellt wurde. Die Daten wurden sorgfältig zusammengestellt, es erfolgte aber keine Qualitätskontrolle (im Sinne des 4-Augenprinzips).

Die Datenbank sowie das Auswerteprogramm (siehe unten) werden in einem separaten Dokument (Handbuch) genauer beschrieben.

3.3 Vergleich der Aktivitäten in Rezeptor-Ligandenbindungstests und Tests auf Reportergergen-Aktivierung in Zellen *in vitro*

3.3.1 Androgenrezeptor

Daten über Androgenrezeptor-Ligandenbindungsstärken wurden aus einer Veröffentlichung der FDA (EDKB FDA) und aus der öffentlich zugänglichen Literatur zusammengestellt. Die Ergebnisse der zellbasierten Reportergergen-Tests stammen überwiegend aus öffentlich zugänglicher Literatur. Die Anzahl der getesteten Substanzen variiert sehr und die gemeinsamen Datensätze, d.h. Substanzen, für die sowohl Ligandenbindungstests als auch zellbasierte Androgenrezeptortests auf agonistisches und/oder antagonistisches Potential vorliegen, sind nicht sehr hoch (siehe Zusammenstellung unten). Für einen Teil der in den Ligandenbindungstests untersuchten Substanzen konnten keine Ergebnisse aus Reportergergen-Test gefunden werden. Einige Stoffe wurden sowohl auf ihre Agonisten- und Antagonisten-Eigenschaften getestet.

Tabelle 7: Anteil der gemeinsamen Datensätze aus Ligandenbindungstests und Reportergergen-Tests

Ligandenbindungstests, Quellen:	Davon auch in AR-Agonist-Zelltest (Reportergergen-Test) untersucht	Davon auch in AR-Antagonisten-Zelltests (Reportergergen-Test) untersucht
FDA-Datensatz (EDKB FDA)	10 %	18 %
Literaturstudie (dieser Bericht)	60 %	35 %

Zur Überprüfung der Sicherheit der negativen Testergebnisse (falsch-negative Resultate sind unerwünscht, da sonst kein Aussortieren von Substanzen erfolgen kann) wurden die Klassifizierungen der verschiedenen Testsysteme verglichen. Negative oder sehr schwach wirkende Substanzen wurden mit 5 klassifiziert (siehe Kapitel 4.1).

Tabelle 8: Vergleich der FDA-Ligandenbindungstests (EDKB FDA, n=202) mit Reportergergen-Tests (Zelltests) auf androgene und antiandrogene Aktivität

Rezeptorbindung AR	Anzahl Substanzen	davon in Zelltests	Klasse 5	Klasse 4	Klasse 3	Klasse 2	Klasse 1
Wirksamkeitsklasse im Zelltest AR Agonisten							
FDA Klasse 5	70	2	2	0	0	0	0
FDA Klasse 4	103	9	8	0	1	0	0
FDA Klasse 3	21	4	0	0	3	0	1
FDA Klasse 2	4	2	0	0	0	2	0
FDA Klasse 1	4	3	0	0	0	1	2
Wirksamkeitsklasse im Zelltest AR Antagonisten							
FDA Klasse 5	70	8	4	1	1	1	1
FDA Klasse 4	103	26	2	1	8	11	4
FDA Klasse 3	21	2	0	0	0	0	2
FDA Klasse 2	4	0	0	0	0	0	0
FDA Klasse 1	4	0	0	0	0	0	0

Es liegen nur wenige gemeinsame Testergebnisse aus Ligandenbindungstests und Reportergergen-Tests (Zelltests) vor. Für Substanzen aus dem FDA-Datensatz (EDKB FDA) und Reportergergen-Tests auf AR Agonisten liegen 20, für Antagonisten 36 gemeinsame Datensätze vor (Tabelle 8). Am Beispiel der Antagonisten (FDA) zeigt sich, dass basierend auf den Li-

gandenbindungstests keine generelle sichere Aussage hinsichtlich "kein Potential" (Klasse 5) getroffen werden kann, da bei den 8 Substanzen, für die gemeinsame Daten vorliegen, nur 50 % der Substanzen als "potentiell inaktiv" (Klasse 5) in den Reportergergen-Tests eingestuft wurden.

Bei den AR Agonisten sind aufgrund der nur 2 gemeinsamen Datensätze in der Klasse 5 keine sicheren Aussagen möglich. Die schwachen AR Liganden (FDA Klasse 4) wurden in Reportergergen-Tests auf Agonisten überwiegend als "inaktiv" (8 von 9 Stoffen) eingestuft. Hier ist zu bedenken, dass die Klassifizierung suboptimal sein kann (siehe Kapitel 4.1). Lag eine höhere Bindungsfähigkeit in den Ligandenbindungstests vor, wurden die Substanzen allerdings als AR-aktivierend identifiziert. Die Daten bestätigen, dass aufgrund der Bindung an den Rezeptor keine Aussagen über agonistische oder antagonistische Eigenschaften vorgenommen werden können.

Ein etwas höherer Anteil gemeinsamer Datensätze für Ligandenbindungstests und zellbasierte Reportergergen-Test wurde mit den aus der Literatur recherchierten Daten zur Rezeptorbindung erhalten, allerdings nur für die Klasse 5 Substanzen (Tabelle 9). Die Mehrzahl der Substanzen war negativ in den Ligandenbindungstest (30 von 37). Von den 11 nicht an den AR-Rezeptor bindenden Substanzen mit gemeinsamen Daten (AR Agonisten) wurden 9 in den Reportergergen-Tests ebenfalls als negativ klassifiziert. Die verbleibenden 2 Substanzen ohne Bindungseigenschaften waren schwach aktiv in den Reportergergen-Tests (Klasse 3), allerdings lässt diese geringe Zahl keine seriöse Schlussfolgerung zu. Bezüglich der Antagonisten waren 11 von den 19 Substanzen ohne die Fähigkeit an den AR-Rezeptor zu binden auch in den Reportergergen-Tests inaktiv, die restlichen 8 Substanzen wurden allerdings als aktiv eingestuft.

Tabelle 9: Vergleich der Ligandenbindungstests aus Literaturrecherchen (n=37) mit Reportergergen-Aktivierungstests (Zelltests) auf androgene und antiandrogene Aktivität

Rezeptorbindung AR	Anzahl Substanzen	davon in Zelltests	Klasse 5	Klasse 4	Klasse 3	Klasse 2	Klasse 1
Wirksamkeitsklasse in Zelltest AR Agonisten							
Lit.-Rech. Klasse 5	30	11	9	0	2	0	0
Lit.-Rech. Klasse 4	0	0	0	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 3	4	1	0	0	1	0	0
Lit.-Rech. Klasse 2	1	0	0	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 1	2	1	0	0	0	0	1
Wirksamkeitsklasse in Zelltest AR Antagonisten							
Rezeptorbindung AR	Anzahl Substanzen	davon in Zelltests	Klasse 5	Klasse 4	Klasse 3	Klasse 2	Klasse 1
Lit.-Rech. Klasse 5	30	19	11	0	4	4	0
Lit.-Rech. Klasse 4	0	0	0	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 3	4	2	1	0	0	0	1
Lit.-Rech. Klasse 2	1	1	0	0	0	0	1
Lit.-Rech. Klasse 1	2	0	0	0	0	0	0

3.3.2 Östrogenrezeptor

Für 41 Substanzen liegen sowohl Östrogenrezeptor Ligandenbindungstests (ER_{alpha}) als auch ER_{alpha}-Reportergergen-Test vor, von denen 17 nicht an ER_{alpha} binden (Klasse 5) (Tabelle

10). Von diesen Substanzen waren 13 in den Reportergergen-Test ebenfalls inaktiv und die restlichen 4 Substanzen zeigten eine geringe Aktivität. Die 10 Substanzen mit schwacher Bindung an ER_{alpha} (Klasse 4) und die stärker bindenden Stoffe (Klassen 1-3) wurden bis auf jeweils 1 Substanz in den Reportergergen-Tests auch als aktiv klassifiziert.

Tabelle 10: Vergleich der FDA-Ligandenbindungstests (EDKB FDA, n=231) mit Reportergergen-Aktivierungstests (Zelltests) auf östrogene Aktivität

Rezeptorbindung ER _{alpha} , FDA	Anzahl Substanzen FDA	davon in Zelltests	Wirksamkeitsklasse im Zelltest ER _{alpha} Agonisten				
			Klasse 5	Klasse 4	Klasse 3	Klasse 2	Klasse 1
FDA Klasse 5	132	17	13	4	0	0	0
FDA Klasse 4	49	10	1	5	4	0	0
FDA Klasse 3	32	9	0	0	6	1	2
FDA Klasse 2	13	2	1	0	0	0	1
FDA Klasse 1	5	3	0	0	0	0	3

Basierend auf den Daten zur Ligandenbindung aus den Literaturrecherchen liegen 108 gemeinsame Datensätze für ER_{alpha} Aktivierung und 43 gemeinsame Datensätze für ER_{beta} Aktivierung in Reportergergen-Tests vor (Tabelle 11). Von diesen Substanzen waren 76 keine ER_{alpha} Liganden. 58 (76 %) von diesen Substanzen waren ebenfalls negativ in den Reportergergen-Tests, 18 Substanzen (24 %) wurden dagegen als ER-Agonisten klassifiziert. Interessanterweise waren 14 der 15 relativ bindungsstarken Substanzen (Klasse 2) in den ER_{alpha} Reportergergen-Tests ohne Wirkung.

Bezüglich des ER_{beta} liegen 43 gemeinsame Datensätze über ER_{beta} Ligandenbindung und ER_{beta} Aktivierung in Reportergergen-Tests vor. Für 27 Substanzen konnten sowohl ER_{beta} Ligandenbindungstests als auch ER_{beta} Aktivierungstests zusammengestellt werden (Tabelle 11).

Beim Vergleich der ER_{alpha} Ligandentest / ER_{beta} Reportergergen-Test Datensätze zeigte sich, dass 30 der 43 Substanzen keine ER_{alpha} Liganden waren, von denen aber 10 (33 %) eine ER_{beta} Aktivierung in den Reportergergen-Tests hervorriefen (66 % Übereinstimmung bezüglich Klasse 5). Der Vergleich der anderen Klassen dieser Datensätze zeigt ebenfalls ein uneinheitliches Muster, wahrscheinlich ein Ausdruck der unterschiedlichen Affinitäten der Substanzen zu den zwei ER-Typen, möglicherweise aber auch aufgrund der weniger etablierten ER_{beta} Testsysteme im Vergleich zu den ER_{alpha} Tests.

Der Vergleich der Testdaten, die nur mit ER_{beta} basierten Tests erhalten wurden, zeigt, dass 78 % (14 von 18 Stoffen) in beiden Testsystemen als negativ (Klasse 5) eingestuft wurden. Der Vergleich der anderen Klassen dieser Datensätze zeigt ein uneinheitliches Muster.

Tabelle 11: Vergleich der ER_{alpha} und ER_{beta} Ligandenbindungstests aus der Literatur (n=261 bzw. 29) mit ER_{alpha} und ER_{beta} Reportergergen-Tests (Zelltests) auf östrogene Aktivität

Rezeptorbindung ER _{alpha}	Anzahl Substanzen	davon in ER _{alpha} Zelltests	Klasse 5	Klasse 4	Klasse 3	Klasse 2	Klasse 1
Wirksamkeitsklasse im Zelltest ER_{alpha} Agonisten							
Lit.-Rech. Klasse 5	207	76	58	11	6	0	1
Lit.-Rech. Klasse 4	0	0	0	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 3	24	13	5	4	2	0	2
Lit.-Rech. Klasse 2	24	15	14	0	1	0	0
Lit.-Rech. Klasse 1	6	4	1	0	0	0	3
Wirksamkeitsklasse im Zelltest ER_{beta} Agonisten							
Rezeptorbindung ER _{alpha}	Anzahl Substanzen	davon in ER _{beta} Zelltests	Klasse 5	Klasse 4	Klasse 3	Klasse 2	Klasse 1
Lit.-Rech. Klasse 5	207	30	20	6	4	0	0
Lit.-Rech. Klasse 4	0	0	0	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 3	24	7	3	1	1	2	0
Lit.-Rech. Klasse 2	24	3	2	0	0	1	0
Lit.-Rech. Klasse 1	6	3	0	0	0	0	3
Rezeptorbindung ER _{beta}	Anzahl Substanzen	davon in ER _{beta} Zelltests	Klasse 5	Klasse 4	Klasse 3	Klasse 2	Klasse 1
Lit.-Rech. Klasse 5	19	18	14	4	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 4	0	0	0	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 3	7	6	3	2	1	0	0
Lit.-Rech. Klasse 2	1	1	1	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 1	2	2	0	0	0	0	2

Zu antiöstrogenen Wirkungen konnten 26 gemeinsame Datensätze von Rezeptorbindung- und Rezeptoraktivierungsstudien zusammengestellt werden (Tabelle 12). 9 Substanzen zeigten keine Bindung an den ER_{alpha}, von denen aber 6 in den Reportergergen-Tests als antiöstrogen klassifiziert wurden. Die 16 gut an den ER_{alpha} bindenden Substanzen (Klasse 1-3) zeigten in den Reportergergen-Tests bis auf 1 Substanz keine antagonistische Eigenschaften.

Tabelle 12: Vergleich der ER_{alpha} Ligandenbindungstests aus der Literatur (n=261) mit ER_{alpha} Reportergergen-Tests (Zelltests) auf antiöstrogene Aktivität

			Wirksamkeitsklasse im Zelltest ER_{alpha} Antagonisten				
Rezeptorbindung ER _{alpha}	Anzahl Substanzen	davon in Zelltests	Klasse 5	Klasse 4	Klasse 3	Klasse 2	Klasse 1
Lit.-Rech. Klasse 5	207	9	3	0	6	0	0
Lit.-Rech. Klasse 4	0	0	0	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 3	24	5	5	0	0	0	0
Lit.-Rech. Klasse 2	24	10	9	0	0	0	1
Lit.-Rech. Klasse 1	6	1	1	0	0	0	0

Eine genauere Analyse der Klasse 1 Substanzen zeigt, dass die 6 Stoffe mit hoher Rezeptorbindungsaffinität auch in den jeweiligen Reportergergen-Aktivierungstest höchste Aktivität zeigen (wenn Daten vorhanden waren), mit Ausnahme eines Stoffes (NOCAS12), der keine Aktivierung des ER_{alpha} (Agonist, Tabelle 11) hervorrufen konnte aber auch nicht als ER_{alpha} Antagonist wirkte (Tabelle 12).

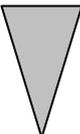
Aufgrund der den zellbasierten Reporter-Test zugrundeliegenden Mechanismen (siehe Kapitel 3.1) wird davon ausgegangen, dass positive Ergebnisse in den Reporter-Tests eine höhere Sicherheit bezüglich der Einstufung als potentiell androgen oder antiandrogen wirksame Substanz bieten als die Aussagen über die reine Fähigkeit zur Ligandenbindung allein.

4 Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen

4.1 Vorbereitung des Datensatzes

Zur Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen waren alle Daten zuvor als "Ja/Nein" (bezogen auf potentielle endokrine Wirkung) zu klassifizieren. Die Heterogenität der Daten erforderte hier ein gestuftes Vorgehen. Teils lagen die Daten schon klassifiziert vor (wie z.B. in dem ECB-Datensatz: vier Klassen von "evidently active" bis "non active"), teils lagen Rezeptorbindungsaffinitäten vor, teils relative Potenzen.

Im ersten Schritt wurde entschieden, alle Ergebnisse sowohl aus den Ligandenbindungstests als auch aus den Reportergergen-Tests in die Klassen "1" bis "5" einzuteilen (1=aktiv, 5=nicht oder sehr gering aktiv. Die relativen Aktivitätsdaten der Reportergergen-Test lagen auf 1 normiert vor (1 = Standard), dagegen wurden die relativen Aktivitätsdaten der Rezeptorbindungstests in % des Standards angegeben. Zur Vereinheitlichung der Angaben der relativen Potenzen wurden Letztere durch 100 dividiert und zur Einstufung der relativen endokrinen Potenz aller Daten folgendes Schema verwendet:

Klasse	Bezeichnung		relative Potenz \geq	relative Potenz $<$
1	stark aktiv		1	1000
2			0.1	1
3			0.001	0.1
4			0.00001	0.001
5	nicht bis sehr schwach aktiv		0	0.00001

Im zweiten Schritt wurde ein Ja/Nein-Kriterium für jede Substanz festgelegt. Für alle Datensätze wurde für die Klassen "1" bis "4" (einschließlich) die Gesamtklassifizierung auf "aktiv" gesetzt, für die Klasse "5" "nicht aktiv". Beim Vorliegen mehrerer Ergebnisse reicht eine "aktiv"-Klassifizierung aus, um insgesamt die Klassifizierung auf "aktiv" zu setzen (worst-case-Prinzip).

Nach Durchführung dieser Klassifizierung sind 307 (von 744) Substanzen als "aktiv" und 437 Substanzen als "nicht aktiv" klassifiziert.

4.2 Anwendbarkeit von Vorfiltern

Vorfilter sollen eindeutig nicht-endokrin wirksame Substanzen erkennen und diese vor einer evtl. aufwendigeren SAR-Analyse aus dem Datensatz entfernen. Wichtig ist, dass diese Vorfilter keine falsch-negativen Ergebnisse liefern, d.h. tatsächliche EDC nicht eliminiert werden.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Vorfilter wurden alleine und in sinnvoll erscheinenden Kombinationen getestet. Die Ergebnisse dieser Überprüfung sind in Tabelle 13 aufgeführt. Zum Verständnis der Tabelle: bei der Anwendung eines Vorfilters wird nur eine Aussage über Un-Wirksamkeit gemacht, es kann hier also keine "positiv"-Vorhersage getroffen werden. Wenn für eine Substanz ein Vorfilter zutrifft, dann sollte diese in jedem Fall unwirksam sein. Ist sie im Experiment dennoch wirksam, so wird sie unten als "falsch-negativ" gezählt. Der Vorfilter "MW < 94" findet nur 12 Substanzen innerhalb des Datensatzes der 784 Substanzen. Von

diesen 12 Substanzen sind 8 tatsächlich als "nicht aktiv" klassifiziert, sie werden also als "korrekt-negativ" gezählt. Die 4 "falsch-negativen" Ergebnisse stehen dann für Substanzen mit einem MW < 94, die als "aktiv" klassifiziert wurden. Über die übrigen 772 Substanzen des Datensatzes (mit einem MW >= 94) wird an dieser Stelle keine Aussage getroffen.

Tabelle 13: Anwendbarkeit von Vorfiltern

Vorfilter	falsch negativ	korrekt negativ	Kommentar
MW < 94	4	8	Die fehlklassifizierten Substanzen wurden nur anhand des ECB-Datensatzes als "aktiv" gefunden. → Der Filter ist anwendbar, da er mit grundsätzlichen Überlegungen (siehe Kapitel 2.3) begründet werden kann.
MW > 1000	0	1	Datensatz zu klein, nicht anwendbar
KEIN phenolisches OH	237	320	Zu hoher Anteil an Fehlklassifizierungen, nicht anwendbar
keine Ringstruktur	14	32	Zu hoher Anteil an Fehlklassifizierungen (auch wenn 9 der 14 falsch-negativ klassifizierten Substanzen lediglich auf Basis der ECB-Daten als "aktiv" eingestuft wurden), der Filter ist nicht anwendbar. Bei drei der falsch-negativ klassifizierten Substanzen handelt es sich um hochfluorierte Stoffe wie z.B.: 3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluoro-1-Hexanol
log K_{OW} < 4,655 UND KEINE phenolische OH	114	257	Zu hoher Anteil an Fehlklassifizierungen, nicht anwendbar
log K_{OW} < 1,485 UND phenolische OH	4	19	Zu hoher Anteil an Fehlklassifizierungen, nicht anwendbar
log K_{OW} < 1,485 UND KEINE phenolische OH	9	108	6 der 9 falsch-negativ klassifizierten Substanzen wurden lediglich auf Basis der ECB-Daten als "aktiv" eingestuft, → der Filter ist bedingt anwendbar
Keine Ringstruktur UND log K_{OW} < 1,485	4	17	Die vier fehlklassifizierten Substanzen wurden lediglich auf der Basis der ECB-Daten als "aktiv" eingestuft. Dimethoat wurde in anderen Untersuchungen als "nicht androgen wirksam" und "nicht östrogen wirksam" gefunden. Für Methylbromid liegen keine weiteren Informationen vor. → Der Filter ist bedingt anwendbar
Keine Ringstruktur UND MW < 94	2	3	Die beiden fehlklassifizierten Substanzen wurden nur auf der Basis der ECB-Daten als "aktiv" eingestuft. Aufgrund der geringen Datenbasis ist keine Aussage über die Anwendbarkeit möglich.
MW < 200 UND KEIN Benzolring	7	84	Diese Kriterien sind bisher nicht beschrieben worden. Die sieben fehlklassifizierten Substanzen wurden nur anhand des ECB-Datensatzes als "aktiv" gefunden. → Filter bedingt anwendbar

Von den in Tabelle 1 genannten Kriterien und deren Kombinationen konnten lediglich die Kriterien "MW < 94" und "Keine Ringstruktur UND log K_{OW} < 1,485" als akzeptable Vorfilter identifiziert werden. Die ODER-Kombination dieser beiden Filter führt jedoch lediglich zu einer Reduktion des Datensatzes um 28 Substanzen (entspricht ca. 4% des Gesamtdatensatzes) bei gleichzeitiger "falsch-negativ"-Klassifizierung von drei Substanzen, die jedoch, wie oben schon ausgeführt, nur auf Basis des ECB-Datensatzes mit unbekannter Datenherkunft und -qualität als "aktiv" eingestuft wurden.

Die UND-Kombination der beiden Filter reduziert den Datensatz um lediglich fünf Substanzen (hier aber ohne falsch-negative), ist also für die praktische Anwendung nicht hilfreich.

Die Filterbedingung "MW < 200 UND KEIN Benzolring" hingegen reduziert den Datensatz um 84 Substanzen (entspricht ca. 11%) und in einer ODER-Kombination mit den anderen Kriterien um 90 Substanzen (ca. 12%) bei 3 bzw. 4 Fehlklassifizierungen (ECB-Datensatz). Die Kombination dieser drei Kriterien erscheint als möglicher Vorfilter für ein Screening großer Datensätze.

Da Vorfilter jedoch auf das eigentliche Ergebnis eines Screenings auf potentiell endokrin wirksame Stoffe keinen Einfluß haben sollten, ist die Anwendung solcher Filter grundsätzlich wenig sinnvoll.

4.3 Anwendbarkeit bekannter Substrukturen zur Identifizierung potenziell endokrin wirksamer Stoffe

Die in Kapitel 2.3 beschriebenen Substrukturen wurden auf ihre Anwendbarkeit als Indikatoren für eine potentielle endokrine Wirkung getestet. Zusätzlich wurden im Laufe der Untersuchungen weitere Substrukturen als mögliche Indikatoren (structural alerts) identifiziert. Alle geprüften Substrukturen sind in Tabelle 40 (im Anhang) mit SMILES-Code und Strukturformel aufgelistet. Die Prüfung erfolgte in 4 Schritten:

- Zunächst wurde für alle Stoffe des in Kapitel 4.1 beschriebenen Trainingsdatensatzes das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der Substrukturen geprüft und eine Matrix aufgebaut, die in den Zeilen die Substanzen des Datensatzes und in den Spalten die Substrukturen enthält. Das Vorhandensein einer Substruktur in einer Substanz wurde mit einer "1" und die Abwesenheit durch eine "0" gekennzeichnet.
- Für jede der Substrukturen wurde dann die Zahl der Substanzen ermittelt, die die Substruktur enthalten UND als aktiv klassifiziert wurden ("korrekt-positiv". Ebenfalls wurde die Anzahl der Substanzen festgestellt, die die Substruktur enthalten, aber als nicht aktiv klassifiziert wurden ("falsch-positiv").
- Wenn eine Substruktur für mindestens 2/3 (66 %, entspricht %-Treffer in Tabelle 14) aller Stoffe, die diese Substruktur enthalten, eine korrekte Vorhersage trifft, dann wird diese Substruktur als Indikator verwendet. Die 66 % sind nicht statistisch begründet, sondern willkürlich festgelegt. Auf diese Weise sollte eine Balance zwischen zuviel "falsch-positiv" und zuviel "falsch-negativ" gehalten werden. Würde man statt der 66% den Wert 50% verwenden, dann ergäbe sich eine deutlich höhere Zahl von "falsch-positiven" ohne damit eine deutliche Verbesserung der Vorhersage zu erhalten. So würde z.B. der Benzolring (ist aus diesem Grund nicht als Indikator verwendet worden!) auf der Basis 50 %-Treffer als Indikator für endokrine Wirkung erkannt.
- Da mit den so gefundenen Substrukturen noch zu viele Substanzen falsch-negativ klassifiziert waren, wurden weitere Indikatoren hinzugenommen. Zum Teil wurden auch Indikatoren verwendet, die etwas unterhalb der 66 %-Treffergrenze lagen, es wurde aber auch, durch genauere Betrachtung der als falsch-negativ klassifizierten Strukturen, weitere neue Indikatoren definiert, die in Kapitel 2.3 nicht aufgelistet sind. So werden jetzt z.B. (poly)-bromierte Diphenylether oder HBCDs als aktiv eingestuft. Desweiteren wurden einige Substrukturen aus Analogiegründen als "alert" eingestuft.

Mit Hilfe der iterativ verbesserten Indikatoren (oder: structural alerts) können 257 von 307 (84 %) aktiven Substanzen erkannt werden. Dagegen werden nur 100 von 437 (23 %) nicht aktiven Substanzen als "aktiv" erkannt (falsch-positiv). Problematisch ist die relativ hohe Zahl falsch-negativ erkannter Stoffe (50 entsprechend 16 %).

Zum Teil sind diese Substanzen aber auch nur als "schwach aktiv" (Kategorie 4) klassifiziert worden. Für das Teilziel des Projektes "Erkennen der wichtigsten Kandidaten" sind diese Ausreißer daher nicht von Bedeutung. In Tabelle 31 (im Anhang) sind alle falsch-negativ klassifizierten Substanzen aufgeführt. Hier sind acht Substanzen zu finden (rot markiert), die in Klasse 1 oder 2 gehören (also deutlich bis stark aktive Substanzen) sowie weitere 26 der Klasse 3 (gelb markiert).

Insgesamt sind also 8 Substanzen falsch-negativ klassifiziert, die deutlich aktiv sind (Klassen 1 und 2) und 26 Substanzen, die nur mittlere Aktivität aufweisen (Klasse 3). Berücksichtigt man die Stoffe nicht, die maximal in Kategorie 4 fallen, ergibt sich also eine Gesamtzahl an 34 "Ausreißern".

Tabelle 14: Anwendbarkeit von Substrukturindikatoren für die Erkennung "aktiver" Substanzen

Structural alert	inaktiv	aktiv	Differenz	%-Treffer	Kandidaten	Kommentar
s.a. 01	8	56	47	87	X	
s.a. 02	0	19	18	100		werden alle durch s.a. 01 erfasst
s.a. 03	0	21	20	100	X	
s.a. 04	1	14	13	93	X	
s.a. 05	2	17	15	89	X	
s.a. 06a	8	18	10	69		nur ein weiteres korrekt-positives Ergebnis, dafür einige falsch-positive mehr als s.a. 05
s.a. 06b	2	15	13	88		ein korrekt-positives und ein falsch-positives mehr als s.a. 04
s.a. 07	0	8	8	100	X	
s.a. 08	7	8	1	53		
s.a. 09	4	5	1	56		
s.a. 10	0	0	0			
s.a. 11	0	1	1	100	X	
s.a. 12	4	7	3	64		
s.a. 12b	8	12	4	60	X	
s.a. 13a	0	0	0			
s.a. 13b	0	0	0			
s.a. 14	35	46	11	57		
s.a. 15a	7	3	-4	30		
s.a. 15b	2	0	-2	0		
s.a. 15c	1	4	3	80	X	
s.a. 16	0	6	6	100	X	
s.a. 17	15	19	4	56	X	Erfasst z.B. DDT-Analoga
s.a. 18	14	11	-3	44	X	
s.a. 19a	2	6	4	75	X	
s.a. 19b	3	4	1	57	X	Analogieschluß zu 19a und 19c
s.a. 19c	3	6	3	67	X	
s.a. 20a	1	0	-1	0		
s.a. 20b	1	0	-1	0		
s.a. 20c	0	6	6	100	X	

Structural alert	inaktiv	aktiv	Differenz	%-Treffer	Kandidaten	Kommentar
s.a. 21	0	1	1	100	X	
s.a. 22	0	0	0			
s.a. 23	6	7	1	54	X	
s.a. 24	2	16	14	89	X	
s.a. 25a	3	3	0	50		
s.a. 25b	17	15	-2	47		
s.a. 25c	3	7	4	70	X	
s.a. 26	98	131	33	57		
s.a. 27	4	7	3	64		
s.a. 28	5	1	-4	17		
s.a. 29	1	0	-1	0		
s.a. 30a	0	2	2	100	X	
s.a. 30b	0	4	4	100	X	
s.a. 31a	1	1	0	50		
s.a. 31b	0	0	0			
s.a. 31c	0	1	1	100	X	
s.a. 32a	0	1	1	100	X	
s.a. 32b	1	3	2	75	X	
s.a. 33	6	0	-6	0		
s.a. 34a	15	39	24	72	X	
s.a. 34b	9	7	-2	44		
s.a. 34c	5	23	18	82	X	
s.a. 34d	2	6	4	75	X	
s.a. 35	8	13	5	62	X	einige aktive Polyaromaten werden erfasst
s.a. 36a	35	28	-7	44		
s.a. 36b	0	0	0			
s.a. 37	1	3	2	75	X	
s.a. 38	2	3	1	60	X	HBCDs sollen erfasst werden
s.a. 39	1	5	4	83	X	
s.a. 40	0	9	9	100	X	
s.a. 41a	0	4	4	100	X	
s.a. 42b	0	0	0			
s.a. 43	14	16	2	53	X	
s.a. 44a	0	0	0			
s.a. 44b	7	8	1	53		
s.a. 45	0	0	0		X	Norbornadien (aus Analogieschluß zu Norbornan und Norbornen)
s.a. 46	6	8	2	57	X	Norbornan-Grundkörper erfasst einige aktive Substanzen
s.a. 47	2	6	4	75	X	Norbornan-Grundkörper erfasst einige aktive Substanzen
s.a. 48a	2	14	12	88	X	BDEs sollen erfasst werden
s.a. 48b	3	11	8	79	X	BDEs sollen erfasst werden
s.a. 48c	3	17	14	85	X	BDEs sollen erfasst werden
s.a. 49	1	3	2	75	X	

4.4 Entwicklung eines Programms zur Durchführung substruktur-basierter SAR-Modelle

Es wurde ein Tool entwickelt, mit dem Substrukturmodelle auf einen großen Datensatz an chemischen Strukturen angewendet werden können. Die Definition der Substrukturmodelle

wird mittels einer einfach zu bedienenden Eingabemaske in MS-Access durchgeführt. Es können Regeln erstellt werden, die sich auf Substrukturen, auf den Verteilungskoeffizienten $\log K_{OW}$ und auf das Molekulargewicht beziehen. Die Regeln können "UND" und "ODER" verknüpft werden. Zur Auswertung der Regeln wurde ein Programm entwickelt, das chemische Strukturen in Form von SMILES-Codes einlesen und anschließend die Modelle auswerten kann.

Das Auswerteprogramm sowie die zugrundeliegende Datenbank werden in einem separaten Dokument (Handbuch) genauer beschrieben.

4.5 Überprüfung der Applicability Domain mittels ACFs

Grundsätzlich hängt die Zuverlässigkeit von Vorhersagen ab von der Zielsetzung und den Grenzen des jeweiligen (Q)SAR-Modells und der Einschätzung, ob dieses Modell für den fraglichen Stoff geeignet ist, um Vorhersagen von seinen Eigenschaften oder Wirkungen zu machen. Die Anwendungsdomäne (AD) eines (Q)SAR Modells umfasst den Bereich der Aktivitäten oder Eigenschaften und chemischen Strukturen, in dem das Modell Vorhersagen mit einer ausreichenden Zuverlässigkeit macht. Für den vorliegenden Datensatz wurde die Methode der "Atom Centered Fragments (ACF)" zur Bestimmung der AD herangezogen. Diese Methode beruht, wie auch das oben beschriebene Modell der structural alerts auf topologischen Eigenschaften der chemischen Struktur. Weitere Parameter, z.B. physiko-chemische Eigenschaften, werden bei dieser Methode nicht verwendet.

ACFs beruhen auf der hypothetischen Zerlegung einer Struktur in Fragmente. Bei den im Folgenden verwendeten ACFs 1. Ordnung wird dabei ausgehend von jedem Nicht-Wasserstoff-Atom des Moleküls ein Fragment aufgebaut, das die Nachbaratome (ohne H) sowie den Bindungstyp zu diesen Nachbaratomen umfasst.

Auf diese Weise wird jede Struktur in n ACFs zerlegt (n=Anzahl Schweratome). Zum Teil gibt es dabei natürlich identische ACFs innerhalb einer Struktur. Diese Prozedur wird für alle Strukturen des Trainingsdatensatzes durchgeführt und alle jemals gefundenen ACFs werden in einer Datenbank zusammengeführt.

Wird nun das SAR-Modell auf eine "neue" Substanz angewandt, so werden auch für diese Substanz alle ACFs ermittelt. Sind alle ACFs der Testsubstanz in der Liste der ACFs des Trainingssets zu finden, so wird die neue Struktur als zur AD gehörend betrachtet. Wenn auch nur eine ACF der Testsubstanz nicht in der Liste der Trainingsset-ACFs ist, wird die Testsubstanz als NICHT zur AD gehörend betrachtet. In der Ergebnistabelle des Programms (siehe Handbuch) wird auch für Substanzen, die nicht zur so definierten Anwendungsdomäne gehören, eine Klassifizierung ausgegeben. Es wird jedoch zusätzlich ein Hinweis auf die Nichtzugehörigkeit zur AD gegeben.

4.6 Anwendung der Methode auf den EINECS-Datensatz

Die in Kapitel 4.3 aufgeführten "Structural Alerts" wurden auf die Strukturen des EINECS-Datensatzes angewendet. Von den 100204 Stoffen der EINECS-Liste liegen für 31215 keine

SMILES-Codes vor. Von den verbleibenden 68989 Stoffen konnten jedoch nur 41768 berechnet werden, bei den restlichen Substanzen handelt es sich um Salze (inkl. quaternärer Ammoniumverbindungen) und Anorganika.

33548 Substanzen fallen in die durch die ACFs definierte Anwendungsdomäne: aus dieser Liste wurden 3585 Stoffe (ca. 11%) als potentielle Kandidaten für endokrine Wirkung gefunden. Damit sind diese Stoffe NICHT als endokrin wirksam identifiziert, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sie aufgrund ihrer chemischen Struktur mit dem ER- oder AR Rezeptor interagieren können. Erst durch weitere Informationen kann geklärt werden ob dieser Stoff auch in Umweltorganismen zu populationsrelevanten Effekten aufgrund einer endokrinen Wirkweise führt und ob im Einzelfall ein solcher Stoff als besonders Besorgnis erregend im Sinne der REACH Verordnung eingestuft werden sollte.

Die identifizierten Stoffe sollten bei entsprechender Evidenz geeigneten Prüfungen unterzogen werden. Weitere 413 Kandidaten sind in den 8220 Stoffen zu finden, die nicht in die AD fallen. Aus prinzipiellen Überlegungen ist die Vorhersagemethode hier nicht anwendbar (siehe oben). Unter dem Vorsorgegesichtspunkt sollten diese Stoffe aber auch Berücksichtigung finden.

5 Gruppierung von Stoffen auf der Grundlage toxikologischer Wirkungen

5.1 Einleitung

Neben den Methoden der *in-silico*-Toxikologie und der Ableitung eines endokrinen Risikopotentials aus strukturellen Eigenschaften einer Substanz, kann unter Umständen eine Fülle an Aussagen aus den vorliegenden toxikologischen *in vivo* Daten extrahiert werden. Um dies zu ermöglichen wurden im Folgenden die relevanten OECD-Guidelines in ihrer aktuellen Version darauf analysiert (Stand: Dez. 2008), welche möglicherweise endokrin-beeinflussten Parameter erhoben werden. Anhand von endokrin-wirksamen Modellsubstanzen wurde daraufhin ausgewertet, ob und welche dieser OECD-Parameter aus *in vivo* Studien sich als Indikatoren einer endokrinen Störung nutzen lassen.

Ziel dieses Arbeitspaketes war es, Endpunkte für mögliche Störung des endokrinen Systems durch Testsubstanzen in Standard *in vivo* Studien zu identifizieren, die

- bei einer Substanzbewertung hinsichtlich ihres endokrinen Potentials herangezogen werden können,
- die zum Abgleich der *in vitro* gefundenen Aktivitäten mit *in vivo* Befunden in Säugern dienen sollen.

Sowohl von der WHO und OECD, als auch von der US EPA wird die Definition eines "endocrine disruptors" weiter gefasst als die im gegenwärtigen Projekt betrachtete Wirkung als Agonist oder Antagonist an Östrogen- und/oder Androgenrezeptor ⁷¹.

Da in den zur Verfügung stehenden *in vivo* Studien der zugrundeliegende Mechanismus der endokrinen Störung zwangsläufig nicht sicher identifiziert werden kann, ist davon auszugehen, dass neben der Rezeptorinteraktionen andere Interaktionen relevant sein können. Um eine vollständigere Auswahl und bessere Validierung von endokrin-beeinflussten Parametern durchführen zu können, wurden über den Rahmen des Projektes hinaus zusätzlich Enzym-inhibitoren der Steroidsynthese und Thyriostatika als häufig anzutreffende Mechanismen einer endokrinen Wirkung in die Untersuchungen mit einbezogen. Bei den Enzyminhibitoren handelt es sich dabei um Substanzen, welche hemmend auf die Aromatase (für die Umwandlung von Androgenen in Östrogene, in der menschlichen Plazenta, in Ovarien und Testes) oder die 5-alpha-Reduktase (Umwandlung von Testosteron in das an vielen Zielorganen wirksamere Dihydrotestosteron, in den Testes) wirken. Die letztgenannten Mechanismen sowie zusätzliche mögliche Interaktionen, z.B. mit Dopamin, Prolaktin oder den Gonadotropinen, der Funktion der Nebennieren oder der Nebenschilddrüsen sollten in weiteren Untersuchungen evaluiert werden

Da vor allem in der pränatalen und juvenilen Entwicklung ein geregeltes Zusammenspiel aller Komponenten des endokrinen System die Voraussetzung aller Entwicklungsvorgänge ist, wurden zum einen in den folgenden Auswertungen auch Einflüsse auf die Steroidsynthese und die Entwicklung der Schilddrüse mit ihrer grundlegenden Steuerungsfunktion in der physiologischen Entwicklung berücksichtigt und alle Auswertungen hinsichtlich endokrin-sensitiver Parameter an Multigenerationsstudien durchgeführt. Mehrgenerationsstudien stellen zum einen den Goldstandard in der reproduktionstoxikologischen Forschung dar und die

Maximalanforderung für Hochtonnage-Substanzen im Rahmen von REACH. Darüber hinaus ermöglichen die in mehreren Generationen und in verschiedensten Entwicklungsstadien erfassten Daten eine möglichst detaillierte Aussage über eine endokrine Beeinflussung des Organismus. Von diesem Maximalangebot von Daten aus soll im Weiteren eruiert werden, welche weiteren Studientypen zur Identifizierung endokriner Störungen herangezogen werden können.

5.2 Daten- und Studienanforderungen unter REACH

Im Rahmen von REACH werden in Abhängigkeit von der jährlichen Tonnage unterschiedliche Studienanforderungen erhoben (Tabelle 15). Aus den in der Tabelle fett markierten Studientypen können Daten zu reproduktionstoxischen Effekten oder zu einer Wirkung auf die Reproduktionsorgane und das endokrine System abgeleitet werden.

Tabelle 15: Unter REACH in der Toxikologie erhobene Daten in Abhängigkeit von der Produktionsmenge

> 1 t/a	> 10 t/a (additional)	> 100 t/a (additional)	> 1000 t/a (additional)
Skin Irritation/Corrosion <i>in vitro</i>	Skin Irritation <i>in vivo</i>	Subchronic Toxicity (90 d)	Long-term Toxicity (> 12 months)
Eye Irritation <i>in vitro</i>	Eye Irritation <i>in vivo</i>	Developmental Toxicity	Reproductive Toxicity (2-Generation)
Skin Sensitization <i>in vivo</i>	Cytogenicity <i>in vitro</i>		Carcinogenicity
Mutagenicity (AMES Test) <i>in vitro</i>	Mutagenicity mammalian cells		
Acute Toxicity (oral)	Acute Toxicity (inhalation)		
	Acute Toxicity (dermal)		
	Repeated Dose Toxicity (28 d)		
	Screening Developmental Toxicity		

Mit zunehmender jährlicher Tonnage steigt das Expositionsrisiko und zusätzliche Untersuchungen werden erforderlich. Ab einer Tonnage von 10 t/a können aus den erhobenen Untersuchungen direkte endokrine Effekte auf die Reproduktionsorgane und die Nachkommenschaft abgeleitet werden.

Um Aufschluss zu geben, welche Parameter unter welchem Studientyp erhoben werden, wurden die unter REACH geforderten sowie zusätzliche Studientypen der OECD Guidelines analysiert. In die vergleichende Übersicht der relevanten OECD Guidelines wurden einbezogen:

- Untersuchungen zur Toxizität bei wiederholter Applikation (14, 21 und 28-Tage-Studien, orale, dermale und inhalative Applikation),
- subchronische (90-Tage-Studien mit oraler, dermalen oder inhalativer Applikation),
- chronische Studien,

- Screening-Studien zur Toxizität in der Entwicklung,
- Studien zur Neurotoxizität,
- klassische reproduktionstoxikologische Studien (pränatal, 1- und 2-Generationsstudien),
- kombinierte Studiendesigns,
- Uterotrophic und Hershberger Assay.

Die innerhalb eines Studientyps erhobenen Daten sind auf das Expositionsszenario und zu erwartende Effekte zugeschnitten und evaluiert. Da subchronische und chronische Expositionen nicht primär der Detektion reproduktionstoxischer Effekte dienen, besteht hier die Notwendigkeit, aus der Fülle der erhobenen Daten reproduktionstoxikologisch relevante Parameter zu ermitteln. Darüber hinaus werden aus den unterschiedlichen reproduktionstoxikologischen Studientypen der Fragestellung angepasste Parameter ermittelt. So dienen z.B. Studien zur pränatalen Entwicklung (OECD Guideline 414) der Abschätzung eines teratogenen Potentials, während Multigenerationsstudien (OECD Guidelines 415 und 416) auf das Fortpflanzungsvermögen und die Entwicklung der Nachkommenschaft fokussiert sind. Studientypen wie der Uterotrophic Assay (OECD Guideline 440) und der Hershberger Assay (OECD Draft Version) wurden speziell zur Detektion endokrin basierter Effekte etabliert, liefern aber keine Aussagen über generationsübergreifende Effekte. Darüber hinaus sollte bedacht werden, dass Guideline-konforme Studien über die geforderten Untersuchungen hinaus erweitert werden können und somit zusätzliche Hinweise zu möglichen Einflüssen und Wirkmechanismen liefern können¹.

Die in Tabelle 16 genannten Parameter stellen eine umfassende, aber nicht vollständige Auswahl reproduktionstoxikologischer Erhebungen dar, welche jedoch in keinem momentan validierten Studientyp in ihrer gesamten Komplexität erhoben werden. Alle aufgeführten Parameter stehen in einem direkten engen Zusammenhang zueinander, können einander beeinflussen und dürfen in ihrem Zusammenspiel nicht getrennt voneinander betrachtet werden. Und alle diese Parameter können primär oder sekundär durch endokrin wirksame Substanzen beeinflusst werden.

Als Beispiele für die angeführten Wechselwirkungen innerhalb und zwischen den Parameterkomplexen 1-4 kann z.B. ein reduziertes Gewicht der Jungtiere einen verspäteten Zeitpunkt der sexuellen Reife hervorrufen, eine verminderte maternale Schilddrüsenfunktion kann Entwicklungsverzögerungen der Jungtiere induzieren oder endokrin bedingte Verhaltensstörungen der Muttertiere können das Überleben der Jungtiere beeinträchtigen.

Da z.B. die subchronischen und chronischen Tests nicht primär der Detektion reproduktionstoxischer Effekte dienen, besteht die Notwendigkeit, aus der Fülle der erhobenen Daten für die einzelnen Tests die reproduktionstoxikologisch relevanten Parameter zu ermitteln. Eine Zusammenfassung der Auswertungen ist Tabelle 16 zu entnehmen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden Parameter, welche in einem engen physiologischen Zusammenhang stehen, zu Parameterkomplexen zusammengefasst:

¹ Es wurden und werden von der OECD große Anstrengungen unternommen, veraltete Guidelines den neuen Anforderungen anzupassen (OECD Guidelines 407, 414, 416, 426) und darüber hinaus neue Guidelines zu etablieren und zu finalisieren, um potentielle endokrine Effekte zu detektieren (z.B. OECD Guideline 440: Uterotrophic Bioassay; Hershberger Assay (Draft-Version)). Allerdings ergibt sich aus dem momentanen Wandel der Guidelines auch die Notwendigkeit, bei Begutachtung von guideline-konformen Studien die zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie jeweils aktuelle Guideline-Version zu beachten.

- Komplex 1: Effekte auf Paarungsverhalten, Fertilität, Schwangerschaft, Geburt und Laktation,
- Komplex 2: Effekte auf die Entwicklung der Nachkommen (Überleben, physische Entwicklung, sexuelle Reifung),
- Komplex 3: Effekte auf die Reproduktionsorgane (Gewicht, Histopathologie, Spermienparameter, Ovarienfunktion),
- Komplex 4: Effekte auf die endokrinen Drüsen und Hormonkonzentrationen.

Tabelle 16: Vereinfachte Zusammenfassung der in OECD Guideline Studien erhobenen reproduktionstoxikologischen Parameter, welche durch endokrine Wirkungen beeinflusst werden können

Parameter	Repeated Dose Studies						Reproductive Toxicity Studies				Neurotoxicity Studies		Endocrine System Screening		
	Repeated Dose Dermal 21/28-day Study; Inhalation 14/28-day	Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents	Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents; OECD 407 enhanced	Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents	Subchronic Dermal / Inhalation Toxicity; 90-day Study	Chronic Toxicity Studies	Combined Repeated Dose Toxicity Study with Reproduction/ Developmental Toxicity Screening Test	Prenatal Developmental Toxicity Study	Reproduction/ Developmental Toxicity Screening Test	One-Generation Reproduction Toxicity	Two-Generation Reproduction Toxicity	Developmental Neurotoxicity Study	Neurotoxicity Study in Rodents	Uterotrophic Bioassay in Rodents	Hershberger Assay
guideline	OECD 410 + 412	OECD 407	OECD 407	OECD 408	OECD 411 + 413	OECD 452	OECD 422	OECD 414	OECD 421	OECD 415	OECD 416	OECD 426	OECD 424	OECD 440	
latest version	1981	1995	2007	revised 1998	1981	1981	1996	2001	1995	1983	2001	2007	1997	2007	2007
Parameter			draft: updated with parameters for endocrine effects							outdated, in revision with parameters for endocrine effects					draft
general toxicity parameter															
body weight/body weight changes in adults	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
mating, fertility, gestation, parturition, lactation															
oestrus cyclicity, preovulatory interval							x	x	x	x	x				
mating index, fertility index, gestation index							x	x	x	x	x				
number of corpora lutea, implantations, pre-/post-implantation loss							x	x	x	x	x				
maternal weight gain during gestation							x	x	x	x	x	x			
gestation length, parturition, dystocia							x	x	x	x	x	x			
litter size, number of stillborn/live offspring, sex ratio							x	x	x	x	x	x			
development of offspring															
external/internal malformations and variations							x	x	x	x	x				
survival of pups							x	x	x	x	x	x			
pup body weight/weight gain							x	x	x	x	x	x			
anogenital distance												o	x		
physical development: pinna detachment, incisor eruption, eye opening, hair growth												o	o		
functional development: reflex ontogeny, motor activity, sensory function, learning and memory												o	x		
sexual development: testes descend, vaginal opening, preputial separation, onset of oestrus											x	x		x	x
reproductive organs															
weight and histopathology: female reproductive organs + follicle counts		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	
histopathology mammary gland (male/female)			x	x	x	x									
weight and histopathology: male reproductive organs + sperm parameter	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x				x
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)															
weight and histopathology: pituitary, thyroid, adrenals	x	x	x	x	x	x	x			x	x				o
serum hormone level LH, FSH, TSH, estradiol, testosterone, DHT, prolactin, progesterone, T3, T4			o												o
additional data for hematology, clinical biochemistry, (urine analysis)				additional data for hematology, clinical biochemistry, urine analysis, ophthalmology, motor activity and sensory reactivity	additional data for hematology, clinical biochemistry, urine analysis, ophthalmology	additional data for hematology, clinical chemistry and urine analysis	additional data on hematology and clinical biochemistry, additional data on sensory reactivity, motor activity, strength				additional pup data on motor activity, sensory function, reflex ontogeny and physical development may be recommended if not covered by other studies		additional data on functional tests and behaviour, hematology, clinical biochemistry, ophthalmology, neuropathology		

5.3 Mögliche Detektion endokriner und reproduktionstoxischer Effekte durch Studienanforderungen unter REACH und Parameter zur Evaluierung

Bei Betrachtung der oben angeführten Effektkomplexe 1-4 zeigt sich, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt von Studien zur wiederholten Applikation (OECD Guidelines 407, 408, 410, 411, 412, 413, 452) lediglich direkte Effekte auf die Reproduktionsorgane in Form von Gewichtsveränderungen und histologischen Veränderungen detektiert werden können. Demgegenüber werden in Studientypen, welche primär auf die prä- und postnatale Entwicklung von Jungtieren fokussieren zwar die Parameterkomplexe 1 und 2 (Verpaarung, Gestation, Laktation, Entwicklung der Nachkommen) abgedeckt, aber Effekte auf die Reproduktionsorgane, die endokrinen Drüsen und Hormonkonzentrationen im Organismus werden weitestgehend übergangen. Eine größtmögliche Abdeckung reproduktionstoxischer Effekte ist somit durch die 2-Generationenstudie (OECD 416) in ihrer aktuellen Version gewährleistet. Eine solche 2-Generationenstudie ist unter REACH erst ab einer jährlichen Produktionsmenge von 1000 Tonnen gefordert und wird somit nur für eine begrenzte Anzahl von Stoffen vorliegen (vgl. Tabelle 17). Liegen entsprechende Daten aus Mehrgenerationsstudien nicht vor, müssen sowohl Studien zur Entwicklungstoxizität und/oder Teratologie als auch zur wiederholten Applikation im Zusammenspiel ihrer Resultate begutachtet werden. Liegen auf Grund einer geringen jährlichen Tonnage (< 10 t) entsprechende Daten nicht vor, kann das Potential einer endokrinen Wirkung am Säugetier und Menschen nur durch ökotoxikologische, *in vitro* und *in silico* Methoden wie Strukturähnlichkeiten zu bekannten und besser untersuchten Stoffen abgeleitet werden.

Die Gesamtheit der Parameter, welche unter OECD Guideline Studien zur wiederholten Applikation und Reproduktionstoxikologie erhoben werden, wurde im Folgenden auf mögliche Veränderungen durch endokrin wirkende Substanzen getestet.

Zur Validierung der ausgewählten Parameter wurden Modellsubstanzen anhand ihres Wirkmechanismus und des Vorliegens von reproduktionstoxikologischen Mehrgenerationsstudien ausgewählt (Tabelle 32, im Anhang). Als Substanzen mit Bindung an den Östrogenrezeptor dienten hierbei 17-beta-Estradiol (ein natürlicher Agonist), Diethylstilbestrol, Tamoxifen und Raloxifen (therapeutisch eingesetzte selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren, SERM), die Industriechemikalie Nonylphenol, das Phytoöstrogen Genistein und das Pestizid p,p'-DDT. Testosteronpropionat, 17-beta-Trenbolon und Flutamid als Therapeutika und die Pestizide Vinclozolin und Procymidon wurden als am Androgenrezeptor bindende Substanzen und Finasteride und Linuron, wie oben erwähnt, als Inhibitoren der Steroidsynthese in die Bewertung mit aufgenommen. Thyroxin (ein physiologisches Schilddrüsenhormon), das Therapeutikum Propylthiouracil und Ammoniumperchlorat wirken direkt auf die Schilddrüse und ihre Hormonproduktion und wurden als Affektoren dieses Organes mitgeführt, um auch diese Komponente adverser endokriner Wirkungen zu zeigen. Genistein und p,p'-DDT stellen darüber hinaus 2 Substanzen dar, welche mit mehr als einem Wirkmechanismus in das endokrine System eingreifen können. Über seine Wirkung am Östrogenrezeptor hinaus hemmt Genistein die Aromataseaktivität und der aktive p,p'-DDT-Metabolit p,p'-DDE wirkt antiandrogen.

Tabelle 17: Zusammenfassung der erhobenen reproduktionstoxikologischen/endokrinen Parameter in Abhängigkeit von der jährlichen Tonnage einer Substanz unter REACH

x=mandatory, minimal layout o=optional, recommended	>10 t/annual tonnage			>100 t/annual tonnage			>1000 t/annual tonnage		
	Repeated Dose Dermal 21/28-day, Inhalation 14/28-day Study	Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents	Reproduction/ Developmental Toxicity Screening Test	Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents	Subchronic Dermal/ Inhalation Toxicity; 90-day Study	Prenatal Developmental Toxicity Study	Chronic Toxicity Studies	Carcinogeni-city Studies	Two-Generation Reproduction Toxicity
OECD guideline	410+412	407	421	408	411+413	414	452	451	416
latest version	1981	2008	1995	revised 1998	1981	2001	1981	1981	2001
Parameter									
mating, fertility, gestation, parturition, lactation									
oestrus cyclicity, precoat interval			x						x
mating index, fertility index, gestation index			x			x			x
number of corpora lutea, implantations, pre-/ post-implantation loss			x			x			x
maternal weight gain during gestation			x			x			x
gestation length, parturition, dystocia			x						x
litter size, number of stillborn/live offspring, sex ratio			x			x			x
offspring development									
external/internal malformations and variations			x			x			x
survival of pups			x						x
pup/foetus body weight/weight gain			x			x			x
anogenital distance									o
offspring physical development									o
offspring functional development									o
offspring sexual development									x
reproductive organs									
weight and histopathology: female reproductive organs + follicle counts		x	x	x	x	x	x	x	x
histopathology mammary gland (male/female)		o		x	x		x	x	
weight and histopathology: male reproductive organs + sperm parameter	x	x	x	x	x		x	x	x
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)									
weight and histopathology: pituitary, thyroid, adrenals	x	x		x	x		x	x	x
serum hormone levels		o							

15 weitere Substanzen mit zwar reproduktionstoxischen Effekten nicht aber endokriner Wirkung dienten als Negativkontrollen. Darüber hinaus wurden 15 Chemikalien mit vermuteter oder bekannter endokriner Wirkung, deren Wirkmechanismus nicht völlig geklärt ist, als "Testsubstanzen" aufgenommen: das Mykotoxin Zearalenon, Tributylzinnchlorid, die Phthalate Butylbenzylphthalat und Di-2-ethylhexyl-phthalat, das Insektizid Lindan, die Phenolderivate Bisphenol A, Pentachlorophenol, 4-Nonylphenol, 2,4-Dichlorophenol, Benzophenon, Nitrobenzol und Ethylbenzol sowie die bromierten Alkane Dibromoessigsäure, 1-Bromopropan und 2-Bromopropan (siehe Tabelle 33, im Anhang).

Um die Vergleichbarkeit der ausgewerteten Publikationen zu erhöhen, wurden nur Studien ausgewählt, welche am toxikologischen Standardmodell, der Ratte, durchgeführt wurden. Aus reproduktionstoxikologischer Sicht stellt die Ratte in ihrer Anatomie, Physiologie und Ontogenese ein gut charakterisiertes, seit langem verwendetes Modell mit einer guten Datenlage an Vergleichsmöglichkeiten zum Menschen dar und stellt das Modell der Wahl zur Detektion endokrin-basierter Effekte dar ⁷².

Alle in der folgenden Aufstellung gezeigten Effekte wurden in den aufgeführten Multigenerationsstudien ⁷³⁻¹⁴⁵ mit den getesteten Dosierungen beobachtet und stellen nicht unbedingt die Gesamtheit aller zu dieser Substanz beobachteten und publizierten Effekte dar. Hierbei wurden alle auftretenden Effekte in allen untersuchten Dosierungen erfaßt und dosis-abhängige Unterschiede wurden nicht analysiert. Es ist somit zu beachten, dass sich

möglicherweise auftretende spezifische Effekte bei niedrigen Dosierungen und unspezifische Effekte nach Gabe hoher Dosen unter Umständen überlagern können. Diese Analysenvariante wurde gewählt, um zu simulieren, welche Daten im Rahmen von REACH als Maximalanforderung zu erwarten sind.

Wie in der Gegenüberstellung (Tabelle 34, im Anhang) deutlich sichtbar, unterscheiden sich die dokumentierten Effekte endokrin wirksamer Substanzen in Abhängigkeit von ihrem Wirkmechanismus. Doch auch innerhalb eines Wirkmechanismus sind die beobachteten Effekte nicht uniform. Dies kann in der Wirkpotenz einer Substanz begründet liegen (z.B. starker ER-Agonist Östradiol vs. schwacher ER-Agonist Nonylphenol) und damit möglicherweise direkt strukturabhängig sein. In der Gegenüberstellung zeigt sich aber auch, wie stark strukturähnliche Substanzen in Multigenerationsstudien in Bezug auf die ausgelösten Effekte variieren können. Als Beispiel dient die Gegenüberstellung der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) Tamoxifen und Raloxifen in 1- und 2-Generationsstudien. Während Tamoxifen (starke ER Bindung *in vitro*) in den ausgewerteten Studien keine Veränderungen der Fertilität der Elterngeneration, der prä- und postnatalen Mortalität oder des Körpergewichtes der Jungtiere hervorruft, sind diese Parameter unter Gabe von Raloxifen (schwache ER Bindung *in vitro*) negativ beeinflusst.

Tabelle 18 fasst die Daten der Gegenüberstellungen zusammen. Hierzu wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit, einzelne Parameter, welche in einem engen physiologischen Zusammenhang stehen, zusammengefasst und Substanzen mit gleicher Zielstruktur kombiniert. Die Zahlenwerte der Datensätze geben an, wie oft in den ausgewerteten Studien diese Parameter untersucht wurden, die prozentualen Angaben zeigen, wie oft diese Parameter negativ beeinflusst wurden. Die Differenz dieser prozentualen Angaben zu 100 % ermöglicht eine Aussage darüber, wie oft ein Parameter zwar untersucht wurde aber keine Veränderungen in den ausgewerteten Studien auftraten.

Tabelle 18: Beeinflussung reproduktionsbiologischer Parameter durch reproduktionstoxische Substanzen ohne endokrine Wirkung sowie durch endokrin wirkender Substanzen mit den Zielstrukturen Östrogenrezeptor, Androgenrezeptor, Aromatase, 5- α -Reduktase und Schilddrüse

	Endokrin wirksame Substanzen								keine endokrine Wirkung			
	Zielstruktur: Östrogenrezeptor		Zielstruktur: Androgenrezeptor		Enzyminhibitoren (Zielstruktur: Aromatase, 5- α - Reduktase)		Zielstruktur: Schilddrüse		EDC gesamt		Reproduktionstoxische Substanzen ohne endokrine Effekte	
	17-beta-Östradiol, DES, Tamoxifen, Raloxifen, Nonylphenol, Genistein, p,p'-DDT		p,p'-DDT, Testosteronpropionat, 17- beta Trenbolon, Vinclozolin, Procymidon, Flutamid		Genistein, Finasterid, Linuron		Thyroxin, Propylthiouracil, Ammoniumperchlorat				Cyclophosphamid, Koffein, Styrol, Toluol, Tetrahydrofuran, Glutaraldehyd, Chloroform, Acrolein, Acrylsäure, 1,1- Dichloro-1-fluoroethan, Methyl tertiary butyl ether, Isopropanol, Schwefelwasserstoff, Zinkchlorid, Schwefelkohlenstoff	
Allgemeine Toxizitätsparameter	Anzahl der Datensätze	adverser Effekt	Anzahl der Datensätze	adverser Effekt	Anzahl der Datensätze	adverser Effekt	Anzahl der Datensätze	adverser Effekt	Anzahl der Datensätze	adverser Effekt	Anzahl der Datensätze	adverser Effekt
Körpergewicht/Gewichtsveränderungen in adulten Tieren	7	86%	7	86%	3	100%	3	67%	20	85%	15	87%
Verpaarung, Fertilität, Trächtigkeit, Laktation												
Östruszyklus, Zeit bis zur erfolgreichen Verpaarung	8	50%	4	25%	2	50%	3	33%	17	40%	4	75%
Verpaarungs-, Fertilitäts-, Gestationsindex	23	43%	13	38%	3	67%	10	0%	49	37%	40	13%
Anzahl Corpora lutea, Implantationsstellen, Prä-/Postimplantationsverluste	16	69%	8	13%	3	33%	3	33%	30	37%	27	26%
Maternale Gewichtszunahme während der Trächtigkeit	6	50%	7	71%	3	100%	2	50%	18	68%	12	92%
Trächtigkeitsdauer, Geburt, Dystozie	7	57%	2	50%	2	0%	4	75%	15	46%	5	20%
Wurfgröße, Anzahl der Tot-/Lebendgeburten, Geschlechterverhältnis	22	32%	18	6%	11	0%	5	80%	56	29%	46	26%
Entwicklung der Nachkommen												
äußere/innere Fehlbildungen und Variationen	6	50%	13	92%	6	67%	0	0%	25	52%	12	67%
Überlebenswahrscheinlichkeit der Jungtiere	9	56%	10	40%	2	50%	6	67%	27	53%	18	39%
Körpergewicht/Zunahme der Jungtiere	13	46%	12	42%	5	20%	6	67%	36	44%	24	79%
Ano-Genitalabstand	5	20%	7	100%	3	67%	0	0%	15	47%	0	0%
Physische Entwicklung: Zeitpunkt von Ohr- und Augenöffnung, Durchbruch der Zähne, Fellwachstum	8	63%	2	0%	4	50%	1	100%	15	53%	8	38%
Funktionelle Entwicklung: Reflexontogenese, lokomotorische Aktivität, Sinnesfunktionen, Lernen und Gedächtnis	5	60%	1	0%	1	100%	3	33%	10	48%	4	0%
Sexuelle Entwicklung: Hodenabstieg, Vaginalöffnung, Präputialseparation, Einsetzen des Östruszyklus	12	67%	13	69%	8	63%	4	75%	37	68%	6	17%
Reproduktionsorgane												
Gewicht und Histopathologie: Weibliche Geschlechtsorgane und Follikelanzahl	25	64%	22	59%	8	50%	3	33%	58	52%	36	17%
Histopathologie: Brustdrüsen (männlich/weiblich)	2	100%	6	100%	3	100%	2	100%	13	100%	1	0%
Gewicht und Histopathologie: Männliche Geschlechtsorgane und Spermparameter	49	47%	61	69%	26	88%	10	20%	146	56%	83	22%
Endokrine Drüsen und Hormonkonzentrationen (exkl. Gonaden)												
Gewicht und Histopathologie: Hypophyse, Schilddrüse, Nebennieren	16	63%	12	42%	4	25%	7	71%	39	50%	24	17%
Serumhormonkonzentrationen: LH, FSH, TSH, Östradiol, Testosteron, DHT, Prolaktin, Progesteron, T3, T4	25	72%	21	57%	2	0%	14	100%	62	57%	6	0%

Wie aus Tabelle 18 zu ersehen ist, zeigen einige der reproduktionstoxikologischen Parameter wenig Aussagekraft über hormonell bedingte Einflüsse. Hierzu gehören Veränderungen des Körpergewichtes, Angaben zur Wurfgröße in Multigenerationsstudien, die Überlebenswahrscheinlichkeit der Jungtiere und deren physische Entwicklung. Die Wahrscheinlichkeit einer negativen Beeinflussung dieser Parameter scheint ähnlich durch reproduktionstoxische Substanzen mit oder ohne endokrines Potenzial. Parameter mit hoher Prädiktivität für endokrine Beeinflussungen sind farblich in Tabelle 18 hervorgehoben (roter Rahmen, fett). Allerdings werden bestimmte aussagekräftige Parameter oftmals nur dann erhoben, wenn bereits ein Anfangsverdacht über eine mögliche Störung der hormonellen Steuerung vorliegt oder wurden in veralteten OECD Guidelines nicht standardmäßig mit erfasst. Hierzu gehören Angaben zur Länge und Normalität des Östruszyklus, Messung des Ano-Genitalabstandes in neonatalen Tieren, Angaben zur sexuellen Reifung (Vaginalöffnung, Einsetzen des Östruszyklus, Hodenabstieg, Präputialseparation), histopathologische Untersuchungen der männlichen und weiblichen Brustdrüsen und die Bestimmung von Serumhormonkonzentrationen. Auch rein statistische Angaben zum Auftreten von Fehlbildungen und Variationen bei der Untersuchung von Föten und Neugeborenen haben wenig Aussagekraft über potentielle endokrine Effekte, wenn nicht gezielt Effekte an den Reproduktionsorganen oder sekundären Geschlechtsmerkmalen betrachtet werden. Eine Zusammenfassung, welche Parameter in welchem Studientyp, in Abhängigkeit von der jährlichen Tonnage, erhoben werden, ist Tabelle 17 zu entnehmen.

5.4 Vergleich substanz-spezifischer Effekte auf juvenile und adulte Organismen

Juvenile (in der Entwicklung begriffene) und adulte Organismen unterscheiden sich physiologisch oftmals grundlegend. Diese Unterschiede zeigen sich in der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von körperfremden Substanzen, in der Ausstattung und Aktivität des Stoffwechsels, im Verhalten und damit in verhaltensabhängigen Expositionsrisiken und in vielen weiteren Aspekten. Dementsprechend kann sich die Empfindlichkeit gegenüber schädigenden Einflüssen in Abhängigkeit von der Entwicklungsphase verändern. Die Komplexität der physiologischen Unterschiede wird dadurch erhöht, dass 1. verschiedene Organsysteme unterschiedlich schnell reifen und dass 2. diese Reifungsprozesse in verschiedenen Spezies zeitlich unterschiedlich ablaufen ^{146,147}.

Besonders empfindliche Phasen durchlaufen Organsysteme während ihrer Anlage (Organogenese, pränatal), Reifung (Histogenese, prä- und postnatal) sowie während der Etablierung regulatorischer Feedback-Mechanismen (z.B. über die Hypothalamisch-Hypophysäre-Gonadale/Thyroidale Achse, prä- und postnatal) ¹⁴⁸⁻¹⁵¹.

Das Szenario, wie aus vorliegenden Studiendaten aus unterschiedlichen Expositionsphasen Effekte auf das Endokrinum abgeleitet werden können sei im Folgenden erklärt. Die Wirkung endokriner Einflüsse auf das sich entwickelnde Urogenitalsystem sei am Beispiel des anti-androgen, potentiell thyreostatisch agierenden Dicarboximid-Fungizides Vinclozolin erläutert. Hierzu wurden 2 Mehrgenerationsstudien herangezogen ^{130,134,152}. Vinclozolin agiert als Antagonist am Androgenrezeptor und führt zu einer Blockade der androgen-abhängigen Genexpression im Organismus. Prä- und postnatale Exposition, d.h. während der Reifung der Reproduktionsorgane, im Vergleich zu alleiniger Exposition im erwachsenen Stadium führen

in beiden Geschlechtern zu unterschiedlichen Effekten (Tabelle 35, im Anhang). Unterschiede in den physiologischen Konsequenzen einer endokrinen Beeinflussung in Abhängigkeit vom Expositionsszenario sind farblich hervorgehoben.

Wie die Daten belegen, kann eine hormonelle Beeinflussung während der Entwicklung weit reichende Konsequenzen für alle folgenden Lebensphasen haben. Erfolgt die antiandrogene Wirkung des Vinclozolin während der Organogenese der Reproduktionsorgane, kann es z.B. zu Fehlbildungen im Sinne einer Hypoplasie oder Agenese, zu morphologischen Feminisierungserscheinungen und zu Funktionsstörungen der endokrinen Drüsen kommen. Im erwachsenen Alter resultieren hieraus erhöhte Inzidenzen von Tumoren der Reproduktionsorgane, eingeschränkte Fertilität, Störungen des Sexualverhaltens und Fehlfunktionen von Hypophyse und Schilddrüse. Erfolgt die Exposition hingegen ausschließlich im erwachsenen Organismus, können die endokrinen Effekte nur mit Hilfe einer aufwendigen histopathologischen Begutachtung (Hoden, Nebenhoden, Samenbläschen, Nebennieren, Hypophyse, Ovarien) und Serumkonzentrationsbestimmungen detektiert werden. Wie Tabelle 35 (im Anhang) zu entnehmen ist, stellt das Pestizid Vinclozolin ein Beispiel für eine endokrin wirksame Substanz dar, bei welcher das Risikopotential schon bei adulter Exposition zu Tage tritt (z.B. durch Veränderungen der Hypophyse und der Reproduktionsorgane sowie von Serumhormonkonzentrationen) aber durch Multigenerationsstudien die schädigenden Effekte weitaus deutlicher werden.

Hieraus ist abzuleiten, dass bei der Beurteilung einer möglichen endokrinen Wirkung einer Substanz folgende Faktoren zu berücksichtigen sind:

- Zeitpunkt und Länge der Exposition (präkonzeptionell, pränatal, perinatal, pubertär, adult),
- Zeitpunkt der Begutachtung (Fötus, juveniler oder erwachsener Organismus),
- Qualitativer Umfang der Untersuchungen (beide Geschlechter, Hormonkonzentrationen, Verhalten, Anogenitalabstand, Spermienparameter, Östruszyklus),
- Quantitativer Umfang der Untersuchungen (ist z.B. die Stichprobenanzahl ausreichend zur Detektion von erhöhten Tumorinzidenzen?).

5.5 Vergleich von Substanzklassen-spezifischen Effekten zwischen Studien mit Mehrfachapplikationen und Mehrgenerationsstudien

Wie schon im Vergleich von substanzspezifischen Effekten auf juvenile und adulte Organismen ausgeführt, können sich die Auswirkungen auf den Organismus unterscheiden, je nach dem, ob der Eingriff in die endokrine Regulation während der Organogenese und Histogenese oder aber nach Abschluß der Reifungsprozesse erfolgt. Da "Repeated-Dose"-Applikationen nach den Vorschriften der Guidelines an adulten Tieren durchgeführt werden, können sich die beobachteten Effekte auf die Reproduktionsorgane und die hormonelle Steuerung erheblich von denen auf juvenile Tiere unterscheiden.

Um diese mögliche Diskrepanz zu verdeutlichen, wurden vergleichende Datenbankenabfragen zu "Repeated-Dose"-Applikationen und zu reproduktionstoxikologischen Studien durchgeführt.

Ein Beispiel einer solchen Datenbankabfrage mit der Vernetzung von Registrierungsnummer, Struktur, Zielorgan, Effekt und LOEL ist in Tabelle 36 im Anhang aufgeführt.

Aus der Gruppe der Phthalatester gibt es eine Reihe von Substanzen mit nachgewiesener Toxizität auf die männlichen Reproduktionsorgane und die männliche Fertilität mit einer erhöhten Sensitivität in der fötalen Entwicklung und in neugeborenen Tieren gegenüber pubertären und erwachsenen Organismen ¹⁵³. Tabelle 37 zeigt den Vergleich einer Abfrage aus einer Datenbank zu wiederholter Applikation und einer Abfrage aus einer reproduktionstoxikologischen Datenbank. Als Abfrageparameter dienten Effekte auf das Gewicht, die Entwicklung und die Histopathologie der Hoden und/oder Effekte auf die Anzahl, Motilität und/oder Morphologie der Spermien der Versuchstiere.

Nach wiederholter Applikation zeigten sich bei 5 von 9 Substanzen/Substanzgemischen Effekte auf die Hoden in adulten Tieren. Dabei war der $LOEL_{\text{Hoden}}$ größer oder gleich dem $LOEL$ des Gesamtorganismus und die Hodentoxizität bestimmte somit nicht den Gesamt- $LOEL$. Es sollte hierbei also nicht nur auf die gesamttoxizitätsbestimmenden Effekte fokussiert werden sondern alle auftretenden Effekte berücksichtigt werden. In der Abfrage der reproduktionstoxikologischen Datenbank zeigten alle untersuchten Phthalate ($n=7$) Effekte auf die Hoden und/oder Spermienparameter. Die ermittelten $LOEL_{\text{Hoden}}$ oder $LOEL_{\text{Spermien}}$ lagen hierbei zum Teil deutlich unter den Angaben zur selben Substanz aus Studien mit wiederholter Applikation. Dies kann sowohl biologische Gründe (Exposition des Organismus über einen weiten Entwicklungszeitraum) als auch studienbedingte Gründe (niedrigere verwendete Dosierungen in Reproduktionsstudien) haben und verdeutlicht erneut die Relevanz von reproduktionstoxikologischen Mehrgenerationsstudien. Allerdings ist die Anzahl der Substanzen für welche reproduktionstoxikologische Studien vorliegen weitaus geringer.

5.6 Gewichtung der beobachteten Effekte für ihre mögliche Relevanz als Indikator für endokrine Wirkungen

Wie bereits betont, ist die Komplexität der Interaktionen und Regulationen innerhalb des endokrinen Systems groß und die Vielschichtigkeit des Problems wird dadurch erhöht, dass endokrin wirksame Substanzen über verschiedene Mechanismen agieren können. Darüber hinaus ist die Anzahl von Substanzen, für welche das reproduktionstoxikologische Maximalprogramm in Form von 2-Generationsstudien vorliegt, begrenzt. Es ergibt sich also die Notwendigkeit, aus den vorliegenden Daten diejenigen zu extrahieren, welche eine Aussage über ein endokrin-wirksames Potential einer Substanz zulassen und diese darüber hinaus einem Ranking ihrer Relevanz zu unterziehen. Um die verschiedenen Parameter, welche als potentiell relevant eingeschätzt wurden, als Indikatoren für eine endokrine Beeinflussung zueinander ins Verhältnis zu setzen, wurde folgendes Schema entwickelt (Abbildung 1).

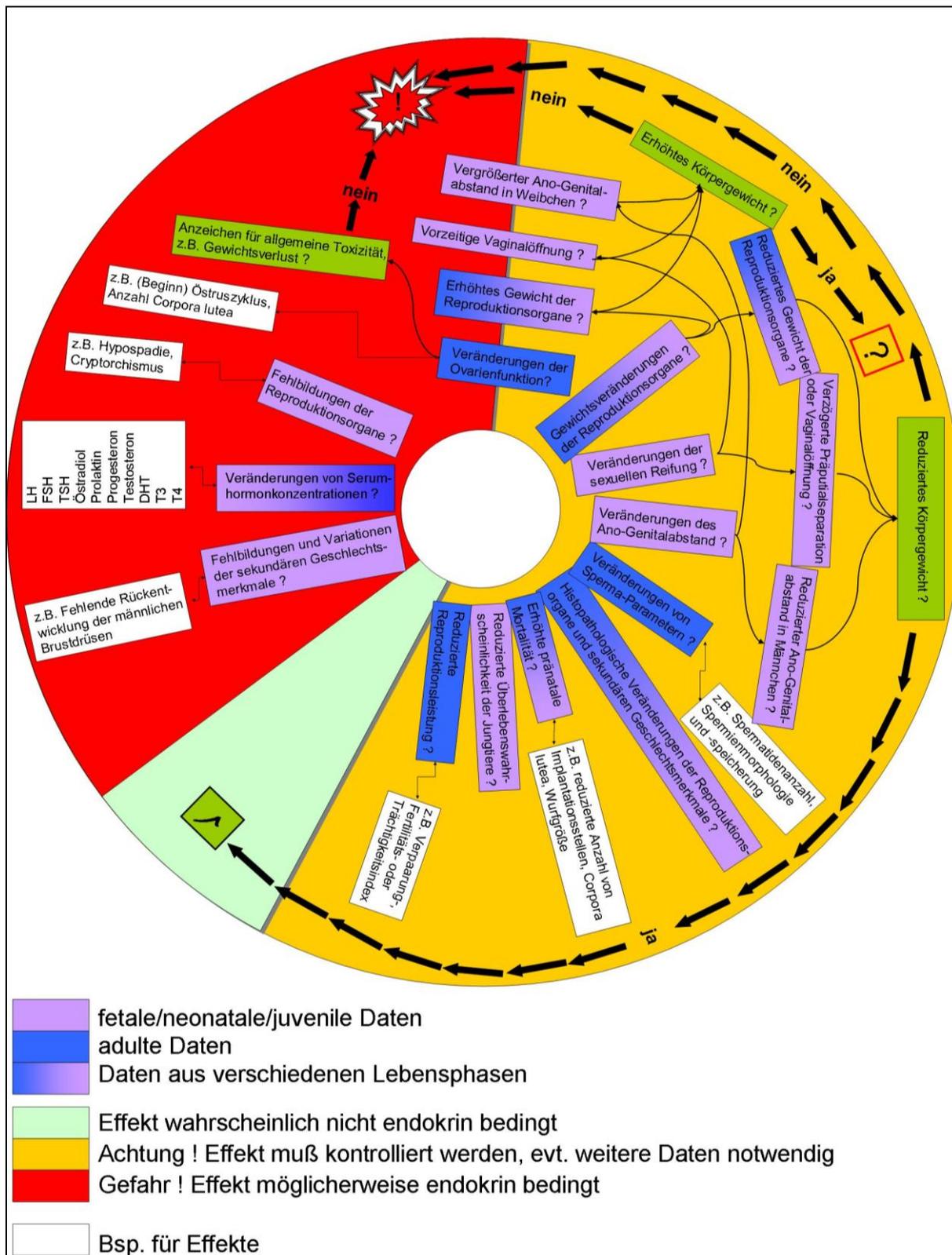


Abbildung 1: Schema zur möglichen Unterscheidung zwischen allgemeinen reproduktions-toxischen Effekten und Eingriffen in das endokrine System

Im Schema wird zwischen hoher Wahrscheinlichkeit endokriner Ursachen (roter Bereich), fraglicher Beteiligung endokriner Einflüsse (gelber Bereich) und unwahrscheinlicher endokriner Beeinflussung (grüner Bereich) unterschieden. Basierend auf den in Tabelle 34 (im Anhang) bei endokrin wirksamen Modellsubstanzen beobachteten Effekten, wurden diese

Parameter in ihrer Bedeutung als Indikatoren gewichtet. Hierbei können Veränderungen der Serumhormonkonzentrationen, isolierte Fehlbildungen der Reproduktionsorgane und Veränderungen der sekundären Geschlechtsmerkmale im Sinne einer Maskulinisierung oder Feminisierung als deutliche Indizien eines gestörten Hormonhaushaltes angesehen werden.

Demgegenüber stehen Parameter, welche in einem engen ursächlichen Zusammenhang mit der Körpergewichtsentwicklung in juvenilen und adulten Organismen stehen. Diese Parameter sind in der Abbildung derart gekennzeichnet, dass von ihnen weitere Entscheidungspfade ausgehen (z.B. ist die verzögerte Sexualentwicklung mit einem einhergehenden eingeschränkten Wachstum gekoppelt?). Kommt es auf Grund toxischer Schädigung zu einer Gewichtsreduktion oder eingeschränkten Gewichtszunahme, können sich damit einhergehend auch die Gewichte der Reproduktionsorgane vermindern. Bei Jungtieren können maternale Effekte (z.B. reduzierte Milchproduktion) oder direkte toxische Einflüsse zu einer verzögerten Gewichtszunahme und einhergehend zu einem verminderten Körperwuchs und einer verzögerten Entwicklung führen. Dies kann z.B. zu einer verzögerten sexuellen Reifung (Vaginalöffnung und Einsetzen des Östruszyklus bei weiblichen Tieren und Präputialseparation bei männlichen Tieren) oder reduzierten Körpermaßen und somit auch zu einem reduzierten Ano-Genitalabstand führen. Treten reduzierte Organgewichte, verringerter Ano-Genitalabstand und Entwicklungsverzögerungen gemeinsam mit reduziertem Körpergewicht oder verringerter Gewichtszunahme auf, ist das Risiko einer substanz-bedingten endokrinen Ursache als eher gering anzusehen. Darüber hinaus kann eine reduzierte Wurfgröße Einfluss auf die postnatale Gewichtszunahme haben. In seltenen Fällen kann es substanz-bedingt zu einer Zunahme des Körpergewichtes und entsprechend gegenläufigen Veränderungen kommen. Viele reproduktionstoxikologische Parameter sollten nur in Zusammenhang mit einem möglicherweise parallel einhergehend allgemeintoxischen Effekt der fraglichen Substanz betrachtet werden. So können Veränderungen der Ovarienfunktion und eine reduzierte Fertilität^{154,155}, eine erhöhte pränatale Mortalität und eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit der Jungtiere auf maternalen toxischen Effekten beruhen.

Somit sollten die Parameter aus dem gelben Bereich entweder in ihrer Abhängigkeit von allgemein-toxischen Einflüssen oder in ihrer Summe im Sinne eines "Weight-of-Evidence" als Indizien für hormonelle kausale Zusammenhänge gewertet werden. Treten multiple Befunde innerhalb dieser fraglich-endokrin-bedingten Gruppe auf, sollten die Werte kontrolliert, zu Körpergewicht und allgemein-toxischen Befunden korreliert und gegebenenfalls gezielte Untersuchungen der Serumhormonkonzentrationen und Reproduktionsorgane veranlasst werden.

Als Beispiel einer solchen Dateninterpretation seien die in Tabelle 35 (im Anhang) angeführten Beobachtungen bei einer prä- und postnatalen Exposition gegenüber Vinclozolin aufgeführt: Hier sprächen die Fehlbildungen der männlichen Geschlechtsorgane, die Feminisierungserscheinungen der männlichen Brustdrüsen und die Veränderungen der Serumkonzentrationen von Schilddrüsen- und Hypophysenhormonen deutlich für endokrine Effekte (roter Bereich), während der verringerte Ano-Genitalabstand, die Gewichtsabnahme der männlichen Reproduktionsorgane und die verringerte männliche Fertilität nur Warnsignale darstellen, da sie mit Anzeichen einer allgemein-toxischen Schädigung (verringertes Körpergewicht und gesteigerte Mortalität) korrelieren (gelber Bereich). Aber auch diese Parameter sollten als "Weight-of-Evidence" in ihrem Zusammenspiel ausreichen, um Bedenken im Umgang mit dieser Substanz hervorzurufen.

5.7 Zusammenfassung

In Abhängigkeit von der in Verkehr gebrachten Menge einer Substanz steigt die im Rahmen von REACH geforderte Datenmenge und hiermit auch die Chance einer Detektion möglicher toxischer Effekte. Bereits ab einer jährlichen Tonnage von 10 t können aus den geforderten Studien mögliche Effekte auf das endokrine System abgeleitet werden. Wie die Analyse der in verschiedenen OECD Guideline Studien erhobenen Parameter zeigte, ist die Komplexität der Daten allerdings hoch und für eine möglichst vollständige Risikoabschätzung erscheint derzeit kein Studientyp vollkommen ausreichend. Die größtmögliche Datenmenge kann in 2-Generationsstudien evaluiert werden, welche aber nur für eine begrenzte Anzahl von Substanzen zur Verfügung steht (jährliche Tonnage > 1000 t). Darüber hinaus können durch die Kombination von Daten aus Repeated-Dose-Applikationen/Langzeittestungen (28 d, 90 d, chronisch) und reproduktionstoxikologischen Studien (Developmental Screening, Developmental Neurotoxicity, Prenatal Development) Aussagen zur Beeinflussung der Parameterkomplexe Fertilität, Trächtigkeit, Jungtierentwicklung, Reproduktionsorgane, Hormonhaushalt getroffen werden.

Als Parameter mit besonderer Aussagekraft in Hinblick auf endokrine Störungen wurden identifiziert:

- Fehlbildungen der Reproduktionsorgane,
- Fehlbildungen und Variationen der sekundären Geschlechtsmerkmale,
- Veränderungen der Serumhormonkonzentration.

Eine Reihe von weiteren Parametern kann darüber hinaus deutliche Hinweise auf Störungen des Hormonhaushaltes liefern, muss aber in vielen Fällen in Abhängigkeit von weiteren Parametern gesehen werden und sollte nur in Zusammenhang mit diesen evaluiert werden. Einfluss nehmende Parameter sind Veränderungen des Körpergewichtes und daraus resultierende Entwicklungsstörungen und allgemein-toxische Befunde. Weitere Befunde und Parameter mit Aussagekraft hinsichtlich ihrer hormonellen Steuerung wären:

- Gewichtsveränderungen der Reproduktionsorgane,
- Histopathologische Veränderungen der Reproduktionsorgane und sekundären Geschlechtsmerkmale,
- Veränderungen von spermatologischen Parametern,
- Veränderungen der ovariellen Funktion,
- reduzierte Reproduktionsleistung,
- erhöhte prä- und postnatale Mortalität,
- Veränderungen der sexuellen Reifung,
- Veränderungen der äußeren Geschlechtsmerkmale im Sinne einer Maskulinisierung oder Feminisierung.

Bei diesen Parametern kann von einem "Weight of Evidence" ausgegangen werden und das Auftreten mehrerer Effekte (unter Beachtung der oben aufgeführten Einfluß nehmenden Faktoren) sollte eine Kontrolle der Daten oder zusätzliche gezielte Erhebung von Parametern induzieren.

Die möglichen Effekte einer endokrin wirksamen Substanz im Tiermodell sind überaus vielseitig und ihre Ausprägung wird mitbestimmt von:

1. **Expositionszeitraum** (präkonzeptionell, prä-/postnatal, juvenil, adult),
2. **Expositionsdauer** (Werden kritische Zeitfenster der Organbildung und -reifung beeinflusst?),
3. **Evaluierungszeitraum** (Ist der zeitliche Abstand zwischen Exposition und Begutachtung ausreichend lang für die Ausbildung adverser Effekte oder sind transiente adverse Effekte eventuell abgeklungen?),
4. **Wirkmechanismus** der Substanz (z.B. Steroidrezeptoragonist, -antagonist, Enzyminhibitor, multiple Wirkmechanismen),
5. **Expositionsdosis** (Überdecken z.B. allgemein-toxische Effekte auftretende endokrine Störungen?),
6. **Potenz** der Wirksubstanz (z.B. schwache vs. potente Rezeptoragonisten).

Somit kann von einer möglichst gesicherten Risikoeinschätzung ausgegangen werden, wenn sowohl Daten aus einer ausreichend langen Exposition von erwachsenen Tieren als auch aus einer perinatalen und juvenilen Exposition vorliegen. Liegen solche Daten nicht vor, muss gezielt evaluiert werden, ob und wie sensitive Parameter in den vorhandenen Studien untersucht wurden und ob hier Veränderungen auftraten. Hierbei sollte genau unterschieden werden, ob ein Organ nicht untersucht wurde oder ob eine makroskopische oder eine mikroskopische Untersuchung keinen pathologischen Befund ergab.

6 Vergleich von substanz-spezifischen Effekten *in vitro* / *in vivo* und in reproduktionstoxikologischen Studien

6.1 Detektion endokriner Effekte in ökotoxikologischen Studien mit Fischen

Zum Vergleich der recherchierten *in vitro* Daten mit Daten aus umweltrelevanten *in vivo* Studien aus dem aquatischen Bereich wurden Ergebnisse aus Studien mit Fischen zusammengestellt, die zur Charakterisierung der Wirkung endokrin aktiver Substanzen durchgeführt wurden. Die Daten wurden der UBA Studie "Charakterisierung endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen: Relevante Parameter für die Entwicklung einer neuen OECD-Testmethode und die Anwendung in der gesetzlichen Umweltrisikobewertung" (Forschungsprojekt FKZ 206 67 470, Schäfers et al. 2007) entnommen.

Ziel der Studie war, die bisher vorliegenden Anwendungserfahrungen von Lebenszyklus-Studien mit Fischen bei endokrin wirksamen Substanzen zu sammeln und zu vergleichen, um allgemeine Aussagen zur Empfindlichkeit von Endpunkten ableiten und Bewertungsunsicherheiten reduzieren zu helfen. Charakteristische populationsrelevante und indikative Endpunkte wurden für die relevanten sexual-endokrinen Wirkmechanismen herausgearbeitet und ein Vergleich der Empfindlichkeiten vorgenommen.

Verwendet wurden Daten aus Full Life Cycle Tests (FLCT) und Zwei-Generationen-Tests des Fraunhofer IME und aus der Literatur. Anhand der Ergebnisse erfolgte anschließend eine Einordnung von Studiendaten aus FLC-Tests aus der Datenbank des Umweltbundesamtes. Im zweiten Teil der Studie wurden Biomarker-Messungen aus Fish Screening Assays (FSA) den Effektdaten von populationsrelevanten Endpunkten aus FLCT gegenübergestellt und bezüglich Empfindlichkeit und Vorhersagepotenzial bewertet.

Für Interaktionen mit dem Östrogenrezeptor (ER) stellt die Sexualentwicklung das empfindlichste Expositionsfenster da. Eine sexual-endokrine Wirkung manifestiert sich am empfindlichsten im Reproduktionsparameter Befruchtungsrate; die Sensitivitäten von Wachstum und Geschlechtsentwicklung liegen nah daran. Ein FSA mit Erfassung der Blutkonzentration von Vitellogenin (VTG) als Wirkindikator reagiert vergleichbar empfindlich und lässt keine falsch negativen Ergebnisse erwarten. Die Androgenrezeptor-(AR-)Interaktionen müssen nach agonistischer und antagonistischer Wirkweise unterschieden werden. VTG ist hier als Biomarker nicht immer aussagekräftig. Der empfindlichste populationsrelevante Endpunkt für den untersuchten AR-Antagonisten ist die Fekundität. Empfindlicher indikativer Endpunkt im FSA und Zwei-Generationen-Test ist das Sexualsteroid 11-keto-Testosteron. Bezüglich der AR-Agonisten ist die Sexualentwicklung das empfindlichste Belastungsfenster und das Geschlechterverhältnis der sensitivste Endpunkt. Auch für die Aromatase-Inhibitoren ist die Sexualentwicklung das empfindlichste Belastungsfenster. Eine sexual-endokrine Wirkung manifestiert sich in unterschiedlichen Endpunkten, deren Empfindlichkeit in den untersuchten Tests meistens nur eine Konzentrationsstufe auseinander lag: In einer Verschiebung des Geschlechterverhältnisses, in Wachstumsverzögerungen oder einer Reduktion der Eizahl. VTG als Wirkindikator reagierte empfindlich im FSA. Die untersuchten Fischarten reagieren grundsätzlich ähnlich empfindlich auf Hormonrezeptor-Interaktionen. Die Ausprägung der Wirkungen kann differieren. So reagieren Medaka und Dickkopfelritze mit einer Verweiblichung auf ER-Agonisten, während der protogyne Zebraäbrbling mit einer Verzögerung oder Hemmung der männlichen Entwicklung reagiert; auf Aromatase-Hemmer

scheint der Zebrabärbling empfindlicher mit einer Vermännlichung zu reagieren, während die Dickkopfelritze empfindlicher mit reduziertem juvenilen Wachstum reagiert. Die Frage nach der Notwendigkeit eines Zwei-Generationen-Tests anstelle eines FLCT hängt von der Relevanz maternalen Transfers von Wirkungen ab und kann aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit der Daten nicht geklärt werden. Um ein verkürztes Testverfahren anstelle des FLCT oder Zwei-Generationen-Tests anzuwenden, bedarf es genauer Informationen über den vorliegenden Wirkmechanismus und des Nachweises, dass das Verfahren das empfindlichste Expositionsfenster und den empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt für diesen Wirkmechanismus erfasst. Partielle Life Cycle Tests (Kurzzeit-Reproduktionstests) sind daher immer ungeeignet. Der Fish Sexual Development Test (FSDT) kann für AR-Agonisten und Aromatase-Hemmer ausreichen. Insgesamt konnten Studien mit 12 Substanzen ausgewertet werden. Die Ergebnisse sind im rechten Teil der Tabelle 19 zusammengefasst.

6.2 Vergleich substanz-spezifischer Effekte durch *in vitro*- und *in vivo*-Modelle

Als nächster Schritt der Arbeiten wurde für die aus den toxikologischen Studien extrahierten Substanzen geprüft, ob entsprechende *in vivo* Daten aus Life Cycle Tests bzw. Screening-Tests mit Fischen und *in vitro* Daten aus Rezeptorbindungstests oder zellbasierten Reporter-Tests vorlagen. In Tabelle 19 sind diese Daten für die Substanzen, für die Ergebnisse aus Fisch Studien vorliegen (FLCT oder FSA) vergleichend dargestellt. In Tabelle 38 und Tabelle 39 (im Anhang) sind alle ausgewählten Modellsubstanzen aus den Säugetierstests aufgelistet und den vorhandenen *in vivo* Fisch- und den *in vitro* Daten gegenübergestellt. In Tabelle 39 (im Anhang) wurden Übereinstimmungen und auftretende Kontroversen zwischen den beobachteten Effekten im Säugetierstest und den *in vitro* Tests farblich hervorgehoben (grün [Übereinstimmung] / weiß [keine Übereinstimmung bzw. keine Daten]). Um eine höhere Datendichte zu gewährleisten, wurden für diesen Vergleich strukturähnliche Substanzen zur weiteren Datenanalyse herangezogen.

Für den Vergleich von Effekten in Säugern und in Fischen stehen nur 8 Substanzen zur Verfügung. Die Übereinstimmung der Daten aus der Säuger- und der Fischtestung ist sehr gut und wird durch die *in vitro* Testergebnisse ergänzt. Es treten keine falsch-negativen Ergebnisse auf, d.h. alle in den Säugetierstudien als "endokrin wirksam" identifizierten Substanzen wurden in den Fischstudien und in den *in vitro* Tests als potentiell wirksam erkannt, wenn auch mit unterschiedlichen Einschätzungen der Wirksamkeitsstärke. Die Detailergebnisse der Fischstudien und der *in vitro* Tests geben teilweise Hinweise auf den zugrundeliegenden Wirkmechanismus (z.B. bei Androgenrezeptor Agonisten).

Tabelle 19: Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Daten der Substanzen, für die Ergebnisse aus Fisch Studien vorliegen (FFLC oder FSA)

Reproductive toxicology database				Reportergergen-Test (Zelltests)				Receptor binding studies		Full-life cycle, <i>Danio rerio</i> *	Fish in vivo effects*	
Compound	CAS	Mechanism	in vivo EDC Effect	Relative potency to positive control				Relative potency to positive control			Fertilisation rate NOEC	Literature FLCT oder PLCT NOEC (Parameter)
				ER Agon.	ER Antag.	AR Agon.	AR Antag.	ER	AR			
17-alpha Ethinylestradiol	57-63-6	ER Agonist	+	strong				strong		0.3 ng/L, stark	1 ng/L juvenil. Wachstum, Gonaden	Zunahme VTG
17-beta Estradiol	50-28-2	ER Agonist	+	strong	no	strong	strong	strong	yes		2.9 ng/L Befruchtungsrate	
Tamoxifen	10540-29-1	Selektiver ER Agonist and Antagonist	+	weak		no	weak	strong	weak	1.6 µg/L und Vtg Reduktion in Weibchen	1.65 µg/L (PLC juvenil. Wachstum 0.11 µg/L (FLC) Vtg Red.	Abnahme VTG
Genistein	446-72-0	ER Agonist, Enzym Inhibitor: Aromatase	+	weak		no		yes	marginal	1.3 µg/L, moderat		
Methyl-Testosterone	58-18-4	AR Agonist		strong							9.98 ng/L => Männchen	
17 beta-Trenbolone	10161-33-8	AR Agonist	+								1 ng/L Sex rate => Männchen, < 1 ng/L Eischädigung	Keine Effekt auf Vtg
Flutamide	13311-84-7	AR Antagonist	+			no	strong			189 µg/L, Ei Produktion F0		Keine Effekt auf Vtg bei 90 ng/L sign. Effekt bei 270 ng/L
Bisphenol A	80-05-7	ER Agonist	+/?	weak		no	yes / weak / no	weak	weak	86 µg/L, schwach	1 µg/L, Histopathologie Testes	Zunahme VTG
4-tert-Pentylphenol	80-46-6	ER Agonist									<51 µg/L, Vtg Männchen	
4-tert-Octylphenol	140-66-9	ER Agonist		weak			yes	weak		11 µg/L, moderat		Zunahme VTG
4-Nonylphenol	84852-15-3	ER Agonist	+/?	weak		weak	yes	weak			4.2 µg/L, Gonado-somatischer Index	
Prochloraz (DMI fungicide)	67747-09-5	Aromatase Inhibitor									< 16 µg/L, Vtg Männchen Zunahme; 64 µg/L Sex Rate => Männchen	Abnahme Vtg

DMI fungicide = demethylation inhibitor (sterol inhibitor), FLC = Full Life Cycle, PLC = Partial Life Cycle

* Daten aus: Schäfers et al. (2007) Charakterisierung endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen: Relevante Parameter für die Entwicklung einer neuen OECD-Testmethode und die Anwendung in der gesetzlichen Umweltrisikobewertung. Forschungsprojekt FKZ 206 67 470

** FLCT durchgeführt im Fraunhofer IME

Als allgemeines Muster lässt sich unter Verwendung der drei Testarten (Tabelle 19) erkennen:

- Östrogenrezeptor Agonisten, bestätigt durch die Ergebnisse aus *in vitro* Tests, induzieren einen Vitellogeninanstieg in Fischen und beeinflussen negativ die Fekundität (Fruchtbarkeit) in den FLCTs.
- Der Östrogenrezeptor Antagonist mit starker Bindung an den ER-Rezeptor *in vitro*, führte aufgrund des reduzierten Östradiollevels zu reduzierten Vitellogeninkonzentrationen im Blutplasma in weiblichen Fischen und zu einer reduzierten Fekundität im FLCT.
- Androgenrezeptor Agonisten verursachten in den Zebraabräblingen eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses hin zu Männchen und wurden entsprechend positiv *in vitro* Tests erkannt.
- Der Androgenrezeptor Antagonist wurde aufgrund der negativen Effekte auf die Eiproduktion im FLCT (Ausbleibende Balz der Männchen) als endokrin aktiv identifiziert und der Wirkmechanismus durch die *in vitro* Testergebnisse bestätigt.

Für den Vergleich von Effekten in Säugern und den Ergebnissen aus *in vitro* Tests steht eine höhere Datendichte zur Verfügung. In Tabelle 39 (im Anhang) sind ausgewählte Modellsubstanzen aufgeführt, deren endokrine Aktivitäten noch auf anderen als der ER/AR Interaktion beruhen. Für 28 Substanzen dieses Modellsubstanzzets lagen *in vitro* Daten vor. Wenn positive Testergebnisse (unabhängig von der Stärke der Wirkung) aus *in vitro* Tests, bevorzugt den Reporter-Gen-Tests, vorlagen, wurden die Substanzen auch in den Säugetierstudien als sicher endokrin oder möglicherweise endokrin eingestuft, solange es sich bei dem Wirkmechanismus um ER/AR-Interaktionen handelte. Das Ausmaß der Ausprägung der Effekte kann aufgrund der *in vitro* Testergebnisse nicht abgeschätzt werden, da den *in vitro* Einstufungen als schwacher Aktivator mehrmals starke Effekte *in vivo* gegenüberstanden.

Die detaillierte Auswertung und der Vergleich aller vorliegenden ER/AR-basierten Daten wird in Kapitel 7 vorgenommen. Als Ausblick kann man bezüglich des Vergleichs der *in vivo* und *in vitro* Daten zusammenfassen:

Der Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Daten für die 51 Stoffe, für die beiden Arten von Testergebnissen vorliegen (Tabelle 22), zeigt, dass sämtliche *in vitro* aktiven Stoffe (Klassen 1-4) auch *in vivo* potentiell aktiv sind. Demgegenüber ist Inaktivität *in vitro* (Klasse 5) kein Indikator für die Abwesenheit von Wirkungen *in vivo* (jeweils 24 von 48, entspr. 50 %). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass anhand von *in vitro* Tests zur ER/AR-Ligandenbindung und zur Reporter-Gen-Aktivierung in Zellen nur etwa die Hälfte der *in vivo* potentiell endokrin wirksamen Stoffe identifiziert werden können. Wenn aber eine *in vitro* Aktivität (Klassen 1-4) festgestellt wird, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer sexualendokrinen Wirkung *in vivo* auszugehen. Damit reflektiert das Ergebnis, dass ER/AR-vermittelte Wirkungen eine Teilmenge aller endokrinen Dysfunktionen sind. Die 24 *in vivo* potentiell aktiven, aber *in vitro* inaktiven Verbindungen (Klasse 5) können teilweise mit anderen Wirkmechanismen und teilweise mit dem Vorhandensein falsch-positiver Klassifizierungen im *in vivo* Datensatz erklärt werden.

7 Integration der chemischen und toxikologischen Methoden zur Identifizierung von potentiell ER/AR-wirksamen Chemikalien

Die Integration verschiedener Verfahren zur Identifizierung von potentiell endokrin wirksamen Chemikalien bietet eine von mehreren möglichen Entscheidungshilfen im Rahmen der Prioritätensetzung für weitergehende Untersuchungen. Die Idealvorstellung einer kombinierten Methodik ist ein gestuftes System, das zunächst anhand einfacher chemischer und/oder toxikologischer Filter unwirksame Stoffe eliminiert und anschließend besonders gefährliche Substanzen fokussiert.

Die Komponenten einer kombinierten Methodik sollten so zusammengestellt sein, dass das Spektrum der relevanten Wirkungen ebenso wie die fraglichen chemischen Strukturen umfassend abgedeckt werden kann. Dazu bedarf es zunächst eines Vergleichs der Aussagekraft und der jeweiligen Anwendungsdomänen (AD) der verfügbaren chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätze, d.h. einer Beschreibung welche Effekte, Interaktionen, etc. für welche Stoffe/Stoffklassen mit den Verfahren gemessen werden können.

In vergleichenden Analysen der chemischen und toxikologischen Methoden zur Identifizierung von potentiell ER/AR-wirksamen Chemikalien werden statistische Kenngrößen (Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität) ermittelt, die die relative Übereinstimmung der Verfahren sowie die Anteile falsch-negativ und falsch-positiv klassifizierter Substanzen angeben. Im Sinne des Vorsorgegedankens von REACH ist die Minimierung falsch-negativ klassifizierter Substanzen von besonderer Bedeutung.

7.1 Aussagekraft von chemischen und toxikologischen Methoden zur Identifizierung von potentiell ER/AR-wirksamen Chemikalien

Unterschiede in der Aussagekraft und Anwendbarkeit der verschiedenen Verfahren zur Identifizierung von potentiell endokrin wirksamen Chemikalien beruhen zumeist auf unterschiedlichen mechanistischen Domänen der Testsysteme hinsichtlich der erfassten Wirkungen (MOA Mode Of Action) und der Berücksichtigung kinetischer Faktoren (Bioverfügbarkeit, Metabolismus, etc). Weil es nicht nur eine "endokrine Wirkung" gibt (kein eindeutig definierter Endpunkt im Sinne der OECD Prinzipien), existiert auch kein "Goldstandard-Testverfahren", an dem die Ergebnisse aus anderen Studien gemessen werden können.

Endokrin wirksame Stoffe in *in vivo* Studien: Langzeit *in vivo* Untersuchungen von Effekten auf Reproduktion und/oder Entwicklung von Säugern können die Auswirkungen einer Störung des endokrinen Systems erfassen (siehe Kapitel 5). Um den Kausalzusammenhang zwischen endokriner Störung und dem beobachteten Effekt, z.B. Rückgang der Reproduktion, herzustellen, bedarf es zusätzlicher endokrin relevanter Messparameter. So können z.B. geringe Veränderungen reproduktiver Parameter durch geringe Veränderungen des maternalen Körpergewichtes verursacht werden (vgl. ^{156,157}). Weil endokrine Effekte keinen definierten Endpunkt sondern einen Symptomenkomplex darstellen, der auf sehr unterschiedlichen toxikologischen Wirkpfaden beruhen kann, sind sie nicht durch ein

einziges Testverfahren erfassbar. Die verschiedenen *in vivo* Testsysteme sind grundsätzlich komplementär, weil sich ihre Ergebnisse zur Interpretation toxikologischer Befunde ergänzen sollen, d.h. kein einzelnes Testverfahren erlaubt eine eindeutige Identifizierung bzw. den endgültigen Ausschluss von endokrinen Wirkungen. Dazu sind vielmehr multiple, sich gegenseitig bestätigende, Testergebnisse notwendig, z.B. verschiedene Untersuchungsparameter an verschiedenen Spezies in verschiedenen Lebensphasen.

Endokrin wirksame Stoffe in *in vitro* Studien: Rezeptor-basierte *in vitro* Tests erfassen die intrinsische Fähigkeit einer Substanz, mit Rezeptoren zu interagieren. Bezüglich der sexualendokrinen Wirkung sind dies der Estrogen- (ER) und der Androgenrezeptor (AR), auf denen der Fokus dieses Vorhaben liegt (siehe Kapitel 3). Die Bindung eines Liganden führt letztendlich zu einer Genaktivierung und Proteinsynthese, d.h. zu einer biologischen Antwort. Die meisten der Testsysteme gehören zu den folgenden drei Kategorien:

- Kompetitiver Ligandenbindungstest, der die Bindungsaffinität einer Chemikalie zu dem Rezeptor misst,
- Reporter-Gen-Test, der die durch Rezeptorbindung ausgelöste Aktivität misst (mRNA oder Protein),
- Zellvermehrungstest, der die durch Rezeptorbindung ausgelöste Zellvermehrung misst.

Der Rezeptor- bzw. Ligandenbindungstest beruht auf dem primären Wirktyp der Steroide, der Bindung an den Rezeptor, die durch physikalisch-chemische und sterische Merkmale des Rezeptors und des Stoffes beeinflusst wird. Die Bedeutung dieser Tests liegt in der Charakterisierung einer Substanz als potentieller Rezeptorligand. Es ist nicht möglich, antagonistische Eigenschaften (Blockierung, Hemmung) und agonistische Eigenschaften, d.h. die Fähigkeit, Transkriptions- und Translationsprozesse auszulösen, zu differenzieren. Die Einbeziehung der letztgenannten Mechanismen erlauben die Reporter-Gen-Tests, die das Potential einer Substanz zur Rezeptoraktivierung in zellbasierten Tests untersuchen. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit bei zellbasierten Tests auch mit metabolischer Aktivierung der Testsubstanzen zu arbeiten,.

Endokrin wirksame Stoffe in SAR-Modellen: Weil sämtliche derzeit verfügbaren SAR-Modelle auf der Basis von Daten aus *in vitro* Reporter-Gen-Tests und Ligandenbindungsassays abgeleitet wurden, entspricht deren mechanistische Anwendungsdomäne der dieser Testverfahren, die aber eingeschränkt wird durch die chemischen Strukturmerkmale des Trainingsdatensatzes. Die strukturelle (topologische) Domäne kann anhand von ACFs 1. Ordnung (kleine Fragmente, aus denen die Substanzen bestehen) erfasst werden (siehe Kapitel 4.5). Ein Vergleich der im Trainingsatz enthaltenen ACFs mit denen des fraglichen Stoffes dient zur Feststellung, ob dieser Stoff in die Anwendungsdomäne des Modells fällt. Nur wenn alle ACFs in dem fraglichen Molekül auch im Trainingsatz vertreten sind, ist dieses Molekül durch die topologische Anwendungsdomäne des Modells abgedeckt.

Endokrin wirksame Stoffe im regulativen Sinn: Im regulativen Bereich können endokrin wirksame Substanzen zu den besonders besorgniserregenden Stoffen (SVHC) gehören, deren giftige Wirkung nicht sofort erkennbar ist und die das Potential in sich tragen, irreversible Schäden zu verursachen. Die Risikobewertung dieser Substanzen unterliegt

besonderen Regeln und erfordert meist Einzelfallentscheidungen, inkl. der möglichen Forderung nach zusätzlichen, erweiterten Testverfahren.

Wie in den vorherigen Kapiteln detailliert aufgezeigt, stellen endokrine Effekte keinen eigenständigen toxikologischen Endpunkt dar, denn sie können durch vielfältige verschiedene Mechanismen, u.a. Rezeptorbindung, hervorgerufen werden. Sie treten häufig erst nach Langzeitexposition auf. Durch die Wirkung auf verschiedene Komponenten des Hormonsystems können eine Vielzahl schädlicher Effekte im Mensch oder Tier hervorgerufen werden¹⁵⁸.

Nicht jede Beeinträchtigung des endokrinen Systems, wie Inhibierung der Hormonsynthese oder Bindung einer Substanz an Estrogen-, Androgen- oder Thyroidrezeptoren muss zu einem adversen Effekt führen. Weitere Faktoren wie Aufnahme, Metabolismus, Verteilung und Ausscheidung im Organismus können die Wirkungen beeinflussen. Diesen wissenschaftlichen Fakten ist in der sog. "Weybridge Definition" Rechnung getragen worden¹⁵⁹. Ein Vergleich der aus den verschiedenen chemischen und toxikologischen Methoden verfügbaren Informationen mit den Ansprüchen unter REACH in Art. 57f zeigt, dass keine der Informationen alleine ausreicht, um einen Stoff eindeutig als SVHC zu identifizieren, aber für manche Wirkmechanismen (und damit einen Teil der potentiellen SVHC) können alle Bausteine wichtige Informationen liefern.

7.2 Vergleichende Analyse der (partiellen) Übereinstimmung von chemischen und toxikologischen Methoden zur Identifizierung von potentiell ER/AR-wirksamen Chemikalien

Aus der in Kapitel 7.1 beschriebenen Aussagekraft und Anwendbarkeit von *in vivo*, *in vitro* und SAR-Verfahren ergibt sich, dass diese Methoden zur Identifizierung von Stoffen mit potentieller Wirkung auf endokrine Systeme verschiedene Bereiche abdecken und dabei nur partiell übereinstimmen können. Die größten Unterschiede betreffen universelle *in vivo* Verfahren und spezifische *in vitro* Assays, da letztere nur jeweils einen von vielen möglichen Wirkpfaden repräsentieren. Chemische *in silico* Verfahren nutzen die funktionellen Ähnlichkeiten von Liganden mit gleichem Wirkmechanismus und bilden die Tests, von denen sie abgeleitet wurden ab.

Für die vergleichende Analyse der (partiellen) Übereinstimmung der Ergebnisse der chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätze wurden drei Datensätze verwendet:

- *in vitro* Daten: Die in Kapitel 3 beschriebene Datenbasis zu Rezeptor-Ligandenbindungstests und Reportergergen-Aktivierung in Zellen wurde für 744 Stoffe ausgewertet. Beim Vorliegen mehrerer Ergebnisse erfolgte die Klasseneinteilung anhand des jeweils niedrigsten Ergebnisses. Die Daten aus der ECB-Liste wurden nicht verwendet, da sie keinem *in vitro* Verfahren zugeordnet werden können. Damit entspricht dieser Teildatensatz demjenigen, der zur Ableitung des Substruktur-Modells (Kap. 4) verwendet wurde.
- *in vivo* Daten: Anhand einer (limitierten) Liste von Effekten, welche für eine endokrine Dysfunktion sprechen können (siehe Kapitel 5.7), wurden 240 organische Stoffe aus der ReproTox-DB und der RepeatedDose-DB des Fraunhofer ITEM extrahiert. Dabei handelt es sich um alle Substanzen in den Datenbanken welche die gelisteten Effekte zeigen, sodass ein unbekannter Anteil falsch-positiver Klassifizierungen (repro-

duktionstoxisch: ja; endokrin wirksam: nein) zu beachten ist. Dies wird unterstützt durch einen Abgleich mit den endokrinen Modellsubstanzen (Tabelle 34, im Anhang), der keine falsch-negativen Befunde ergab.

- *in silico* Daten: Das in Kapitel 4.3 beschriebene Substruktur-Modell wurde auf die 933 Stoffe der *in vivo* und *in vitro* Datenbasen angewendet und ein Klassifizierungsergebnis als "Candidate: yes" oder "Candidate: no" erhalten.

Der dritte Datensatz (*in silico*) enthält alle Strukturen, für die entweder *in vivo* und/oder *in vitro* Testergebnisse vorliegen. Von den insgesamt 933 Stoffen liegen für 693 nur *in vitro* Daten, für 189 nur *in vivo* Daten und lediglich für 51 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Daten vor. Die sehr geringe Überlappung der *in vivo* und *in vitro* Datensätze mit lediglich 51 Stoffen zeigt, dass für einen sehr großen Anteil der *in vivo* reproduktionstoxischen Stoffe korrespondierende *in vitro* Befunde, die zur Absicherung des Wirkungsmechanismus dienen können, nicht publiziert sind. Die geringe Überlappung der Teildatensätze führt weiterhin dazu, dass sich für die paarweisen Vergleiche der chemischen und toxikologischen Methoden zur Identifizierung von potentiell ER/AR-wirksamen Chemikalien jeweils verschiedene Grundgesamtheiten ergeben, die zumeist nicht mit dem Datensatz zur Ableitung des Substruktur-Modells (Kap. 4) übereinstimmen. Aus diesem Grund können die absoluten Zahlen zu den einzelnen Verfahren abweichen, die dann auf der Basis prozentualer Abweichungen und Übereinstimmungen vergleichbar sind.

Die Ergebnisse der paarweisen Vergleiche der Einstufung von Chemikalien als potentiell endokrin wirksam anhand der chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätze wurden über die Gesamt-Übereinstimmung der Befunde (Richtigkeit), das Auftreten falsch-negativer Befunde (Sensitivität) und das Auftreten falsch-positiver Befunde (Spezifität) quantifiziert (TP: true positive; TN: true negative; FP: false positive; FN: false negative):

$$\text{Richtigkeit} = \frac{(TP + TN)}{Tot} \times 100;$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100;$$

$$\text{Spezifität} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100.$$

Die übereinstimmenden Klassifizierungen (TP, TN) sind in den nachfolgenden Tabellen blau hinterlegt, während abweichende Einstufungen (FP, FN) gelb gekennzeichnet sind. Bei der Berechnung der Detailergebnisse der paarweisen Vergleiche wurde grundsätzlich das jeweils "höhere" System (*in vivo* > *in vitro* > *in silico*) als Referenz verwendet.

Der Vergleich der Ergebnisse der *in vitro* und *in silico* Klassifizierungen zeigt insgesamt eine gute Übereinstimmung von 80 % (Tabelle 20). Von den *in vitro* aktiven Stoffen (Klassen 1-4) werden 16,3 % (50 von 307) falsch-negativ klassifiziert (Candidate: "no"). Relativ zu allen *in vitro* inaktiven Stoffen (Klasse 5) beträgt der Anteil falsch-positiver Klassifizierungen (Candidate: "yes") 22,9 % (100 von 437). Bemerkenswert ist, dass die Vorhersagen des Substruktur-Modells umso besser sind, je ausgeprägter die Aktivität *in vitro* ist, d.h. Stoffe in

den *in vitro* Klassen 1 und 2 werden besser klassifiziert als schwach-aktive und nicht-aktive Substanzen der Klassen 3, 4 und 5.

Tabelle 20: Detaillierergebnisse des paarweisen Vergleichs der *in vitro* und *in silico* Befunde (n = 744)

Richtigkeit = 79,8 % (Gesamtübereinstimmung)
 Sensitivität = 83,7 % (→ 16,3 % falsch-negative Klassifizierungen)
 Spezifität = 77,1 % (→ 22,9 % falsch-positive Klassifizierungen)

	<i>in vitro</i> Klasse 1	<i>in vitro</i> Klasse 2	<i>in vitro</i> Klasse 3	<i>in vitro</i> Klasse 4	<i>in vitro</i> Klasse 5	Σ
Candidate: "yes"	33	60	84	80	100	357
Candidate: "no"	2	6	26	16	337	387
Σ	35	66	110	96	437	744

Betrachtet man die Detaillierergebnisse in Tabelle 20 klassenweise, ergeben sich sehr unterschiedliche Fehlerquoten (Tabelle 21). Insbesondere starke Binder (Klassen 1 und 2) werden durch das Substruktur-Modell gut erkannt (Abweichungen < 10 %), während die Klassifizierung von (sehr) schwachen Rezeptorliganden unsicherer ist (Abweichungen > 15 %).

Tabelle 21: Fehlerquoten des klassenweisen Vergleichs der *in vitro* und *in silico* Befunde (n = 744)

Klasse 1	5,7 %
Klasse 2	9,1 %
Klasse 3	23,6 %
Klasse 4	16,7 %
Klasse 5	22,9 %

Der Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Daten für die 51 Stoffe, für die beide Arten von Testergebnissen vorliegen (Tabelle 22), zeigt, dass sämtliche *in vitro* aktiven Stoffe (Klassen 1-4) auch *in vivo* potentiell aktiv sind. Demgegenüber ist Inaktivität *in vitro* (Klasse 5) kein Indikator für die Abwesenheit von Wirkungen *in vivo* (jeweils 24 von 48, entspr. 50 %). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass anhand von *in vitro* Tests zur ER/AR-Ligandenbindung und zur Rezeptorgen Aktivierung in Zellen nur etwa die Hälfte der *in vivo* potentiell endokrin wirksamen Stoffe identifiziert werden können. Wenn aber zusätzlich eine *in vitro* Aktivität (Klassen 1-4) festgestellt wird, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer sexualendokrinen Wirkung *in vivo* auszugehen. Damit reflektiert das Ergebnis, dass ER/AR-vermittelte Wirkungen eine Teilmenge aller endokrinen Dysfunktionen sind. Die 24 *in vivo* potentiell aktiven, aber *in vitro* inaktiven Verbindungen (Klasse 5) können teilweise mit anderen Wirkmechanismen und teilweise mit dem Vorhandensein falsch-positiver Klassifizierungen im *in vivo* Datensatz erklärt werden.

Tabelle 22: Detailergebnisse des paarweisen Vergleichs der *in vivo* und *in vitro* Befunde (n = 51)

Richtigkeit = 52,9 % (Gesamtübereinstimmung)
 Sensitivität = 50,0 % (→ 50 % falsch-negative Klassifizierungen)
 Spezifität = 100 % (→ KEINE falsch-positiven Klassifizierungen)

	<i>in vitro</i> Klasse 1	<i>in vitro</i> Klasse 2	<i>in vitro</i> Klasse 3	<i>in vitro</i> Klasse 4	<i>in vitro</i> Klasse 5	Σ
<i>in vivo</i> potentiell aktiv	6	6	11	1	24	48
<i>in vivo</i> inaktiv	0	0	0	0	3	3
Σ	6	6	11	1	27	51

Der Vergleich der Ergebnisse des Substruktur-Modells mit der potentiellen *in vivo* Aktivität (Tabelle 23) ergibt für den reduzierten Datensatz des *in vivo/in vitro* Vergleichs (n = 51) ähnliche Ergebnisse wie die *in vitro* Klassifizierung. Auch das Substruktur-Modell liefert keine falsch-positiven Ergebnisse, doch der Anteil falsch-negativer Vorhersagen ist erheblich zu hoch.

Tabelle 23: Detailergebnisse des paarweisen Vergleichs der *in vivo* und *in silico* Befunde (n = 51)

Richtigkeit = 49,0 % (Gesamtübereinstimmung)
 Sensitivität = 45,8 % (→ > 50 % falsch-negative Klassifizierungen)
 Spezifität = 100 % (→ KEINE falsch-positiven Klassifizierungen)

	Candidate: "yes"	Candidate: "no"	Σ
<i>in vivo</i> potentiell aktiv	22	26	48
<i>in vivo</i> inaktiv	0	3	3
Σ	22	29	51

Die Anwendung des Substruktur-Modells ergibt für den gesamten Datensatz zur potentiellen *in vivo* Aktivität (n = 240) deutlich schlechtere Ergebnisse, weil viele *in vivo* aktive Stoffe (inkl. möglicherweise falsch-positiven) nicht erkannt werden (Tabelle 24). Damit liefert auch die zusätzliche *in silico* Klassifizierung "Candidate: yes" einen eindeutigen Hinweis auf sexual-endokrine Wirkungen von Stoffen *in vivo*, während die *in silico* Klassifizierung "Candidate: no" nicht als Indikator für die Abwesenheit von Wirkungen *in vivo* dienen kann.

Wird die Anwendung der *in silico* Klassifizierung auf diejenigen Substanzen des gesamten Datensatzes beschränkt, die in die topologische AD des Substrukturmodells fallen (n = 215), ist die Vorhersage der potentiellen *in vivo* Aktivität nicht signifikant besser. Lediglich der Anteil falsch-negativer Kandidaten reduziert sich durch die Berücksichtigung der AD von 192 auf 171, bleibt aber > 80 %.

Tabelle 24: Detailergebnisse des paarweisen Vergleichs der *in vivo* und *in silico* Befunde (n = 240)

Richtigkeit = 20,0 % (Gesamtübereinstimmung)
 Sensitivität = 15,4 % (→ > 80 % falsch-negative Klassifizierungen)
 Spezifität = 100 % (→ KEINE falsch-positiven Klassifizierungen)

	Candidate: "yes"	Candidate: "no"	Σ
<i>in vivo</i> potentiell aktiv	35	192	227
<i>in vivo</i> inaktiv	0	13	13
Σ	35	205	240

Die grundsätzliche Übereinstimmung der *in vitro* und *in silico* Klassifizierungen (Tabelle 20) wird indirekt bestätigt durch die Ergebnisse der jeweiligen paarweisen Vergleiche mit den *in vivo* Befunden (Tabelle 22, Tabelle 23, Tabelle 24). Die oben ausführlich dargestellten und in Tabelle 25 zusammengefassten Ergebnisse der paarweisen Vergleiche der chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätze demonstrieren eindrucksvoll, dass die verschiedenen Biotests und chemischen Klassifizierungsverfahren kein hierarchisches sondern eher ein komplementäres System darstellen.

Tabelle 25: Übersicht der Übereinstimmungen von chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätzen

	n	Gesamt-Übereinstimmung	Sensitivität	Spezifität
<i>in vitro</i> / <i>in silico</i>	744	79,8 %	83,7 %	77,1 %
	51	84,3 %	79,2 %	88,9 %
<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>	51	52,9 %	50,0 %	100 %
<i>in vivo</i> / <i>in silico</i>	51	49,0 %	45,8 %	100 %
	240	20,0 %	15,4 %	100 %

Anhand eines direkten Vergleichs der *in vitro* und *in silico* Klassifizierungen für den gesamten Datensatz (n = 933), der als Zusatzinformation die Aktivität *in vivo* berücksichtigt (Tabelle 26), lassen sich die Anwendungsmöglichkeiten der Kombination von chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätzen exemplarisch darstellen.

Dazu ist zunächst festzustellen, dass sämtliche positiven Klassifizierungen *in vitro* und/oder *in silico* nur Stoffe betreffen, die *in vivo* als potentiell endokrin wirksam eingestuft sind. Von diesen 48 Stoffen liegen für 19 einander bestätigende Ergebnisse aus allen drei Gruppierungsansätzen vor, weitere 5 Stoffe mit potentieller *in vivo* Aktivität werden nur *in vitro* aber nicht aufgrund ihrer chemischen Struktur erkannt. 3 Substanzen mit potentieller *in vivo* Aktivität, aber ohne *in vitro* Aktivität (Klasse 5), werden *in silico* identifiziert, während für 21 Substanzen weder *in vitro* Befunde noch *in silico* Klassifizierungen Hinweise auf ER/AR-Wirksamkeit liefern. Daraus ist zu folgern, dass eine Auswertung nur auf der Basis von *in vivo* Befunden an Säugern die Gefahr birgt, dass reproduktionstoxische Stoffe als EDC identifiziert werden, deren Wirkweise nicht der endokrine Wirkpfad ist.

Für die 13 *in vivo* inaktiven Substanzen liegen auch aus den *in vitro* und/oder *in silico* Klassifizierungen keinerlei Hinweise auf eine sexualendokrine Wirkung vor. Damit wird bestätigt, dass *in vivo* Befunde in Studien zur Reproduktionstoxizität an Säugern ein notwendiges aber kein hinreichendes Indiz für endokrine Wirkungen sind.

Liegen keine Angaben zu Wirkungen *in vivo* vor (n = 693), liefern *in vitro* Befunde und *in silico* Klassifizierungen Hinweise auf Kandidaten für weitere Untersuchungen. Eine Entlastung von Stoffen ist mit diesen Gruppierungsansätzen aber nicht möglich, weil dieses Screening die Gefahr birgt, dass Substanzen mit anderen endokrin-relevanten Wirkmechanismen nicht erkannt werden (viele falsch negative).

Tabelle 26: Vergleich der *in vitro* und *in silico* Klassifizierungen unter Berücksichtigung der *in vivo* Befunde (n = 933)

	<i>in vitro</i> Klasse 1	<i>in vitro</i> Klasse 2	<i>in vitro</i> Klasse 3	<i>in vitro</i> Klasse 4	<i>in vitro</i> Klasse 5	keine Angaben zur <i>in vitro</i> Aktivität	Σ
<i>in vivo</i> potentiell aktiv							
Candidate: "yes"	6	5	7	1	3	13	35
Candidate: "no"	0	1	4	0	21	166	192
<i>in vivo</i> inaktiv							
Candidate: "yes"	0	0	0	0	0	0	0
Candidate: "no"	0	0	0	0	3	10	13
keine Angaben zur <i>in vivo</i> Aktivität							
Candidate: "yes"	27	55	77	79	97	0	335
Candidate: "no"	2	5	22	16	313	0	358

Die Auswertung der Ergebnisse des Vergleichs von chemischen und toxikologischen Methoden zur Identifizierung von potentiell ER/AR-wirksamen Chemikalien ergibt:

- Stoffe, die *in vivo* potentiell endokrin wirksam sind UND *in vitro* aktiv sind UND *in silico* als "Candidate: yes" klassifiziert werden, sind mit großer Wahrscheinlichkeit EDC im Sinne des Art. 57f der REACH-VO (19 von 933 Stoffen, entspr. 2,0 %, rot unterlegt).
- Stoffe, die *in vivo* potentiell endokrin wirksam sind UND entweder *in vitro* aktiv sind ODER *in silico* als "Candidate: yes" klassifiziert werden, sind mit erheblicher Wahrscheinlichkeit EDC und sollten weitergehend untersucht werden (16 von 933 Stoffen, entspr. 1,7 %, orange unterlegt).
- Stoffe, für die keine Angaben zur potentiellen endokrinen Wirksamkeit *in vivo* vorliegen, die aber *in vitro* aktiv sind UND *in silico* als "Candidate: yes" klassifiziert werden, sind mit einiger Wahrscheinlichkeit EDC und damit Kandidaten für weitergehende Untersuchungen (238 von 933 Stoffen, entspr. 25,5 %, gelb unterlegt).

- Stoffe, für die keine Angaben zur potentiellen endokrinen Wirksamkeit *in vivo* vorliegen, die aber entweder *in vitro* aktiv sind ODER *in silico* als "Candidate: yes" klassifiziert werden, sind mit geringerer Wahrscheinlichkeit EDC und damit Kandidaten zweiter Priorität für weitergehende Untersuchungen (142 von 933 Stoffen, entspr. 15,2 %, hellgelb unterlegt).
- Stoffe, die *in vivo* UND *in vitro* inaktiv sind UND *in silico* als "Candidate: no" klassifiziert werden, sind mit großer Wahrscheinlichkeit keine EDC im Sinne des Art. 57f der REACH-VO (3 von 933 Stoffen, entspr. 0,3 %, grün unterlegt).
- Die 313 Stoffe (33,5 %, hellgrün unterlegt), für die keine Befunde zur *in vivo* Wirkung vorhanden sind, die *in vitro* inaktiv sind UND die *in silico* Klassifizierung "Candidate: no" ist, sind ebenso wie die 10 Stoffe (1,1 %, hellgrün unterlegt), die *in vivo* inaktiv sind, aber zu denen keine Angaben zur *in vitro* Wirksamkeit vorliegen UND die *in silico* Klassifizierung "Candidate: no" ist, nur mit geringer Wahrscheinlichkeit EDC und damit Kandidaten nachrangiger Priorität für weitergehende Untersuchungen.

Die Auswertung der Ergebnisse des Vergleichs von chemischen und toxikologischen Methoden zur Identifizierung von potentiell ER/AR-wirksamen Chemikalien führt zu folgenden Schlussfolgerungen:

- Die chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätze stimmen im Hinblick auf toxikologische Wirkmechanismen und funktionelle Ähnlichkeiten der Testsubstanzen nur partiell überein.
- Screening nur auf der Grundlage von *in vitro* Tests zur Charakterisierung von Substanzen als potentielle ER/AR-Rezeptorliganden birgt die Gefahr, dass Substanzen mit anderen endokrin-relevanten Wirkmechanismen nicht erkannt werden (viele falsch negative).
- Eine Auswertung nur auf der Basis von *in vivo* Untersuchungen von Effekten auf Reproduktion und/oder Entwicklung an Säugern birgt die Gefahr, dass Stoffe als EDC identifiziert werden, deren Wirkweise nicht der endokrine Wirkpfad (Störung sexual-endokriner und andere endokriner Mechanismen) ist (viele falsch positive).
- Die Kombination von chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätzen liefert sehr gute, einander ergänzende Informationen, die zur gegenseitigen Unterstützung Evidenz-basierter Bewertungen "endokrin wirksam: Ja/Nein" herangezogen werden können. Experimentelle Befunde, die diese These stützen, sind auch in der aktuellen Literatur zu finden ¹⁶⁰.

7.3 Anwendung der Gruppierungsansätze in der Prioritätensetzung

Die komplementäre, nicht-hierarchische Natur der chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätze erlaubt es nicht, eine lineare Kombination der Verfahren zu konzipieren, die zunächst anhand einfacher chemischer und/oder toxikologischer Filter unwirksame Stoffe

eliminiert und anschließend besonders gefährliche Substanzen fokussiert. Stattdessen erzwingen die nur partiell überlappenden Anwendungsdomänen der Verfahren ein paralleles Vorgehen im Sinne Evidenz-basierter Bewertungen "endokrin wirksam: Ja/Nein".

7.3.1 Identifizierung besonders besorgniserregender Stoffe (= Prioritätenliste)

Mit der Zielsetzung der Erstellung einer Prioritätenliste besonders besorgniserregender Stoffe (SVHC) mit sexualendokrinen Wirkungen, d.h. die Fokussierung der diesbezüglich gefährlichsten Chemikalien, wird folgendes Vorgehen vorgeschlagen:

1. Bei Vorliegen von Studien zur Reproduktionstoxizität und/oder Repeated-Dose-Studien sollten alle Stoffe herausgefiltert werden, die Veränderungen der in Kapitel 5.7 genannten Parameter aufweisen:
 - Fehlbildungen der Reproduktionsorgane,
 - Fehlbildungen und Variationen der sekundären Geschlechtsmerkmale,
 - Veränderungen der Serumhormonkonzentration,
 - Gewichtsveränderungen der Reproduktionsorgane,
 - Histopathologische Veränderungen der Reproduktionsorgane und sekundären Geschlechtsmerkmale,
 - Veränderungen von spermatologischen Parametern,
 - Veränderungen der ovariellen Funktion,
 - reduzierte Reproduktionsleistung,
 - erhöhte prä- und postnatale Mortalität,
 - Veränderungen der sexuellen Reifung,
 - Veränderungen der äußeren Geschlechtsmerkmale im Sinne einer Maskulinisierung oder Feminisierung.
2. Liegen außerdem Klassifizierungen als *in vitro* = aktiv und/oder SAR-Vorhersagen "Candidate: yes" vor, ist dies ein eindeutiger Hinweis, dass der Stoff ein potentieller ER/AR A(nta)gonist in Säugetieren ist. Die Evidenz wird gestützt durch die Spezifität von 100 %, d.h. keine falsch-positiven Klassifizierungen, der Korrelationen der *in vivo* Befunde mit *in vitro* und *in silico* Ergebnissen. Die gute Korrelation der *in vivo* Effekte in Säugerstudien und Fischstudien zeigt, dass dieses Ergebnis auch für Umweltorganismen relevant ist.
3. Die anhand von (1) und (2) priorisierten Stoffe sollten vordringlich einer weiteren Überprüfung ihres Potentials für endokrine Wirkungen unterzogen werden.

7.3.2 Identifizierung weiterer Verdachtsstoffe

Keiner der vorliegenden Gruppierungsansätze weist eine Sensitivität von 100 % auf, d.h. kann sicher falsch-negative Befunde ausschließen. Daher ist keines der Verfahren geeignet, Verdachtsstoffe zuverlässig von der Klassifizierung "endokrin wirksam" zu entlasten. Daraus folgt im Umkehrschluss, dass alle Stoffe, die mit einem der Gruppierungsansätze gerastert werden potentielle Verdachtsstoffe sind, deren tatsächliche Wirksamkeit mit weiteren

Prüfungen zu verifizieren/falsifizieren ist. Im Sinne einer Kosten- und Ressourceneffizienz ist folgendes Vorgehen plausibel:

1. Anhand des Vorfilters "Strukturmerkmale" können Kandidaten für weitere Verdachtsstoffe identifiziert werden (wohlwissend dass die Nicht-Kandidaten nicht "unwirksam" sein müssen).
2. *in vitro* Testung kann zur Eingrenzung/Bestätigung der Verdachtsstoffe führen (auch hier bleibt das Risiko dass die Nicht-Kandidaten nicht "unwirksam" sein müssen).
3. Wenn aufgrund der Befunde von (1) und (2) die Aufnahme eines Stoffes in die Prioritätenliste erwogen wird, sollte eine weitere Überprüfung des Potentials des Stoffs für endokrine Wirkungen erfolgen.

Die vorgeschlagene Vorgehensweise bedeutet im Fall der EINECS-Substanzen (Kapitel 4.6), dass 3585 Stoffe (ca. 11 %) potentielle Kandidaten für endokrine Wirkungen sind ebenso wie weitere 413 aus den 8220 Stoffen, die nicht in die Anwendungsdomäne fallen. Damit ist nicht gesagt, dass diese Stoffe tatsächlich endokrine Wirkungen haben, eine genauere Betrachtung wäre unter dem Vorsorgegesichtspunkt aber wünschenswert. Andererseits ist eine Entlastung der 38183 Strukturen ohne "Alerts" mit den derzeit verfügbaren Screening-Verfahren nicht abschließend möglich.

Die chemischen und toxikologischen Gruppierungsansätze können gemäß den Ergebnissen dieses Vorhabens nicht die in sie gesetzten Hoffnungen zur eindeutigen Identifizierung von endokrin wirksamen Stoffen als SVHC erfüllen, bieten dennoch erhebliches Potential sowohl zur Priorisierung besonders besorgniserregender Stoffe als auch der Identifizierung weiterer Verdachtsstoffe.

8 Literaturverzeichnis

1. European Commission. REGULATION (EC) No 1907/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. European Commission, Brussels, Belgium (2006).
2. Schäfers,C. & Teigeler,M. Testen und Bewerten - eine Teststrategie für Fische. In: Umweltbundesamt (ed.). 3. Statusseminar "Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endocrine System. Wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung und Regulierung". Fraunhofer IRB Verlag, ISBN 3-8167-6968-3: 105-115. 2005.
3. Devillers,J., Marchand-Geneste,N., Doré,J.C., Porcher,J.M. & Poroikov,V. Endocrine disruption profile analysis of 11,416 chemicals from chemometrical tools. *SAR QSAR Environ. Res.* **18**, 181-193 (2007).
4. Schmieder,P., Koleva,Y. & Mekenyan,O.G. A reactivity pattern for discrimination of ER agonism and antagonism based on 3-D molecular attributes. *SAR QSAR Environ. Res.* **13**, 353-364 (2002).
5. Ankley,G.T., Bradbury,S.P., Hermens,J.L.M., Mekenyan,O.G. & Tollefsen,K.E. SETAC-Europe / OECD / EC Expert Workshop on Endocrine Modulators, Wildlife-Assessment and Testing, (EMWAT) Workshop, 10-13 April 1997, The Netherlands.1997).
6. Devillers,J., Marchand-Geneste,N., Carpy,A. & Porcher,J.M. SAR and QSAR modeling of endocrine disruptors. *SAR QSAR Environ. Res.* **17**, 393-412 (2006).
7. Fang,H., Tong,W., Welsch,W.J. & Sheehan,D.M. QSAR models in receptor-mediated effects: the nuclear receptor superfamily. *J. Molec. Struct. (Theochem)* **622**, 113-125 (2003).
8. Tong,W. *et al.* Predicting Chemical Toxicity and Fate. Cronin,M.T.D. & Livingstone,D.J. (eds.), pp. 285-314 (Taylor and Francis, London, UK,2004).
9. Hong,H. *et al.* Prediction of estrogen receptor binding for 58,000 chemicals using an integrated system of a tree-based model with structural alerts. *Environ. Health Persp.* **110**, 29-36 (2002).
10. Mizutani,M.Y., Tomioka,N. & Itai,A. Rational automatic search method for stable docking methods of protein and ligand. *J. Mol. Biol.* **243**, 310-326 (1994).
11. Yumi,A. Development of a 3D-QSAR (3-dimensional quantitative structure-activity relationships) model for predicting binding potency to human estrogen receptor α . - Presentation: 2nd meeting of the validation management group for non-animal testing (VMG-NA) of the task force on endocrine disruptors testing and assessment (EDTA) 4-5 November 2004, OECD, Paris. 2004.
12. Bradbury,S.P., Mekenyan,O.G. & Anley,G.T. The role of ligand flexibility in predicting biological activity: structure-activity relationships for aryl hydrocarbon, estrogen, and androgen receptor binding affinity. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 15-25 (1998).
13. Mekenyan,O.G. *et al.* Development and validation of an average mammalian estrogen receptor-based QSAR model. *SAR QSAR Environ. Res.* **13**, 579-595 (2002).

14. Schmieder, P., Mekenyan, O.G., Bradbury, S.P. & Veith, G.D. QSAR prioritization of chemical inventories for endocrine disruptor testing. *Pure Appl. Chem.* **75**, 2389-2396 (2003).
15. Shi, L. *et al.* An integrated '4-phase' approach for setting endocrine disruption screening priorities - phase I and II predictions of estrogen receptor binding affinity. *SAR QSAR Environ. Res.* **13**, 69-88 (2002).
16. Tong, W. *et al.* Regulatory application of SAR/QSAR for priority setting of endocrine disruptors: A perspective. *Pure Appl. Chem.* **75**, 2375-2388 (2003).
17. Tong, W. *et al.* Assessment of prediction confidence and domain extrapolation of two structure-activity relationship models for predicting estrogen receptor binding activity. *Environ. Health Persp.* **112**, 1249-1254 (2004).
18. Klopman, G. & Chakravarti, S.K. Screening of high production volume chemicals for estrogen receptor binding activity (II) by the MultiCASE expert system. *Chemosphere* **51**, 461-468 (2003).
19. Klopman, G. & Chakravarti, S.K. Structure-activity relationship study of a diverse set of estrogen receptor ligands (I) using MultiCASE expert system. *Chemosphere* **51**, 445-459 (2003).
20. Serafimova, R. *et al.* QSAR and mechanistic interpretation of estrogen receptor binding. *SAR QSAR Environ. Res.* **18**, 389-421 (2007).
21. Müller, M. SAR-system - estimating environmental relevant chemical properties from structure. In: Jochum, C. ; Gesellschaft Deutscher Chemiker -GDCh-, Fachgruppe Chemie, Information, Computer -CIC-: Software-Entwicklung in der Chemie. Proceedings 8. Workshop Frankfurt/Main, 1994, S.225-233. 1994.
22. Nendza, M., Jäckel, H., Müller, M., Gies-Reuschel, A. & Klein, W. Estimation of exposure and ecotoxicity related parameters by computer based structure-property and structure-activity relationships. *Toxicol. Environ. Chem.* **40**, 57-69 (1993).
23. Wiandt, S. & Müller, M. PropertEst - a software system of environmental QSARs for chemical assessment. Poster at the 11th International Workshop on Quantitative Structure-Activity Relationships in Environmental Sciences (QSAR 2004), Liverpool, England, 9. - 13.5.2004. 2004.
24. Blair, R.M. *et al.* The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.* **54**, 138-153 (2000).
25. Katzenellenbogen, J.A. The structural pervasiveness of estrogenic activity. *Environ. Health Persp.* **103**, 101 (1995).
26. Schultz, T.W., Sinks, G.D. & Cronin, M.T.D. Structure-activity relationships for gene activation oestrogenicity: evaluation of a diverse set of aromatic chemicals. *Environ. Toxicol.* **17**, 14-23 (2002).
27. DSSTox. http://www.epa.gov/ncct/dsstox/sdf_nctrer.html (2007).
28. Fang, H. *et al.* Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 1338-1358 (2003).
29. Tamura, H. *et al.* Structural basis for androgen receptor agonists and antagonists: Interaction of SPEED 98-listed chemicals and related compounds with the androgen receptor based on an in vitro reporter gene assay and 3 D-QSAR. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 7160-7174 (2006).

30. Gallegos Saliner,A., Netzeva,T.I. & Worth,A.P. Prediction of estrogenicity: Validation of a classification model. *SAR QSAR Environ. Res.* **17**, 195-223 (2006).
31. Netzeva,T.I., Saliner,A.G. & Worth,A.P. Comparison of the applicability domain of a quantitative structure-activity relationship for estrogenicity with a large chemical inventory. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 1223-1230 (2006).
32. Nilsson,S. *et al.* Mechanism of estrogen action. *Physiol. Rev.* **81**, 1535-1565 (2008).
33. Ankley,G.T. *et al.* Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 68-87 (1998).
34. Legler,J. *et al.* Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci* **48**, 55-66 (1999).
35. Legler,J. *et al.* Detection of estrogenic activity in sediment associated compounds using in vitro reporter gene assays. *Sci. Tot. Environ.* **293**, 69-83 (2002).
36. Legler,J., Leonards,P., Spenkelink,A. & Murk,A.J. In vitro biomonitoring in polar extracts of solid phase matrices reveals the presence of unknown compounds with estrogenic activity. *Ecotoxicology* **12**, 239-249 (2003).
37. Demirpence,E., Duchesne,M.J., Badia,E., Gagne,D. & Pons,M. MVLN cells: A bioluminescent MCF-7-derived cell line to study the modulation of estrogenic activity. *J Steroid Biochem. Molec. Biol.* **46**, 355-364 (1993).
38. Pons,M., Gagne,D., Nicolas,J.C. & Mahtali,M. A new cellular model of response to estrogens: A bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules. *Biotechniques* **9**, 450-459 (1990).
39. Zacharewski,T.R., Berhane,K., Gillesby,B.E. & Burnison,B.K. Detection of estrogen- and dioxin-like activity in pulp and paper mill black liquor and effluent using in vitro recombinant receptor/reporter gene assays. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 2140-2146 (1995).
40. Zacharewski,T.R. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 613-623 (1997).
41. Gutendorf,B. & Westendorf,J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* **166**, 79-89 (2001).
42. Routledge,E.J. & Sumpter,J.P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 241-248 (1996).
43. Le Dréan,Y., Kern,L., Pakdel,F. & Valotaire,Y. Rainbow trout estrogen receptor presents an equal specificity but a differential sensitivity for estrogens than human estrogen receptor. *Molec. Cell. Endocr.* **109**, 27-35 (1995).
44. Pfeffer,U., Fecarotta,E., Arena,G., Forlani,A. & Vidali,G. Alternative splicing of the estrogen receptor primary transcript normally occurs in estrogen receptor positive tissues and cell lines. *J Steroid Biochem. Molec. Biol.* **56**, 99-105 (1996).
45. Sluysers,M. Role of estrogen receptor variants in the development of hormone resistance in breast cancer. *Clinical Biochem.* **25**, 407-414 (1992).
46. Legler,J. *et al.* Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 4410-4415 (2002).

47. Beresford,N., Routledge,E.J., Harries,C.A. & Sumpter,J.P. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicol Appl Pharmacol* **162**, 22-33 (2000).
48. Graumann,K. & Jungbauer,A. Agonistic and synergistic activity of tamoxifen in a yeast model system. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 177-185 (2000).
49. Gaido,K.W. *et al.* Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* **143**, 205-212 (1997).
50. Nishikawa,J.I. *et al.* New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol Appl Pharmacol* **154**, 76-83 (1999).
51. Saito,K., Tanaka,A., Takahashi,K. & Yakou,Y. Comparison of yeastbased estrogen receptor assays. *Water Sci. Technol.* **46**, 349-354 (2002).
52. Lippman,M., Bolan,G. & Huff,K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **36**, 4595-4601 (1976).
53. Soto,A.M., Lin,T.M., Justicia,H., Silvis,R.M. & Sonnenschein,C. An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-screen). *Adv. Mod. Env. Toxicol.* **21**, 295-309 (1992).
54. Soto,A.M. *et al.* The E-screen assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* **103 (Suppl 7)**, 113-122 (1995).
55. Soto,A.M. *et al.* Assays to measure estrogen and androgen agonists and antagonists. Reproductive Toxicology. *Adv. Exp. Med. Biol.* **444**, 9-28 (1998).
56. Kinnberg,K. Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. Working Report No. 43. 2003. Danish Environmental Protection Agency, Denmark.
57. Araki,N., Ohno,K., Nakai,M., Takeyoshi,M. & Iida,M. Screening for androgen receptor activities in 253 industrial chemicals by in vitro reporter gene assays using AR-EcoScreen(TM) cells. *Toxicology in Vitro* **19**, (2005).
58. Satoh,K., Ohyama,K., Aoki,N., Iida,M. & Nagai,F. Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food and Chemical Toxicology* **42**, (2004).
59. Vinggaard,A.M., Hnida,C. & Larsen,J.C. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro. *Toxicology* **145**, (2000).
60. Andersen,H.R., Vinggaard,A.M., Hoj Rasmussen,T., Gjermandsen,I.M. & Cecilie Bonefeld-Jorgensen,E. Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity in Vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179(1). 2002.
61. Sun,H. *et al.* Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. *Chemosphere* **66**, (2007).
62. Sun,H., Xu,L.-C., Chen,J.-F., Song,L. & Wang,X.-R. Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **44**, (2006).

63. Wilson,V.S., Bobseine,K., Lambright,C.R. & Gray,L.E., Jr. A Novel Cell Line, MDA-kb2, That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicol Lett* **66**(1). 2002. 1-3-2002.
64. Schrader,T.J. & Cooke,G.M. Interaction between tris(4-chlorophenyl)methanol and the human androgen receptor in vitro. *Toxicology Letters* **136**, (2002).
65. Schultis,T. & Metzger,J.W. Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with. *Chemosphere* **57**, (2004).
66. Schreurs,R.H.M.M., Sonneveld,E., Jansen,J.H.J., Seinen,W. & van der Burg,B. Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **83**, (2005).
67. Matthews,J.B. *et al.* Ability of structurally diverse natural products and synthetic chemicals to induce gene expression mediated by estrogen. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **82**, (2002).
68. Liu,C., Du,Y. & Zhou,B. Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* **85**, (2007).
69. Nakazawa,H. *et al.* In vitro assay of hydrolysis and chlorohydroxy derivatives of bisphenol A diglycidyl ether for estrogenic activity. *Food and Chemical Toxicology* **40**, (2002).
70. Bovee,T.F.H. *et al.* A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonists and antagonists. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, (2007).
71. European Commission. European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Weybridge 2-4 Dec 1996. Report Eur 17549. 1996. Environment and Climate Research Programme, DG XII.
72. Gray,L.E., Jr. *et al.* Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. *ILAR. J* **45**, 425-437 (2004).
73. Yamasaki,K. *et al.* Effects of in utero and lactational exposure to tamoxifen in SD rats. *Toxicol Lett.* **156**, 289-296 (2005).
74. Clarke,D.O., Griffey,K.I., Buelke-Sam,J. & Francis,P.C. The selective estrogen receptor modulator, raloxifene: reproductive assessments following preimplantation exposure in mated female rats. *Reprod Toxicol* **12**, 247-259 (1998).
75. Delclos,K.B. *et al.* Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol* **15**, 647-663 (2001).
76. Hojo,H. *et al.* Two-generation reproduction toxicity study in rats with 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (p,p'-DDT). *Congenit. Anom. (Kyoto)* **46**, 105-114 (2006).
77. Wolf,C.J., Hotchkiss,A., Ostby,J.S., LeBlanc,G.A. & Gray,L.E., Jr. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. *Toxicol Sci* **65**, 71-86 (2002).
78. Wolf,C.J., LeBlanc,G.A. & Gray,L.E., Jr. Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat. *Toxicol Sci* **78**, 135-143 (2004).

79. Hotchkiss,A.K., Furr,J., Makynen,E.A., Ankley,G.T. & Gray,L.E., Jr. In utero exposure to the environmental androgen trenbolone masculinizes female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett.* **174**, 31-41 (2007).
80. Ostby,J. *et al.* The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicol Ind. Health* **15**, 80-93 (1999).
81. Bowman,C.J., Barlow,N.J., Turner,K.J., Wallace,D.G. & Foster,P.M. Effects of in utero exposure to finasteride on androgen-dependent reproductive development in the male rat. *Toxicol Sci* **74**, 393-406 (2003).
82. Tyl,R.W. *et al.* Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* **68**, 121-146 (2002).
83. Rosato,R.R., Gimenez,M.S. & Jahn,G.A. Effects of chronic thyroid hormone administration on pregnancy, lactogenesis and lactation in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* **127**, 547-554 (1992).
84. Becci,P.J. *et al.* Combined two-generation reproduction-teratogenesis study of zearalenone in the rat. *J Appl Toxicol* **2**, 201-206 (1982).
85. Andrade,A.J. *et al.* A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. *Toxicology* **225**, 64-74 (2006).
86. Grande,S.W., Andrade,A.J., Talsness,C.E., Grote,K. & Chahoud,I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: effects on female rat reproductive development. *Toxicol Sci* **91**, 247-254 (2006).
87. Bernard,B.K., Hoberman,A.M., Brown,W.R., Ranpuria,A.K. & Christian,M.S. Oral (gavage) two-generation (one litter per generation) reproduction study of pentachlorophenol (penta) in rats. *Int J Toxicol* **21**, 301-318 (2002).
88. Ema,M. *et al.* Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol* **15**, 505-523 (2001).
89. Dodd,D.E. *et al.* Reproduction and fertility evaluations in CD rats following nitrobenzene inhalation. *Fundam. Appl Toxicol* **8**, 493-505 (1987).
90. Faber,W.D. *et al.* Two generation reproduction study of ethylbenzene by inhalation in CrI-CD rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **77**, 10-21 (2006).
91. Christian,M.S. *et al.* Oral (drinking water) two-generation reproductive toxicity study of dibromoacetic acid (DBA) in rats. *Int J Toxicol* **21**, 237-276 (2002).
92. Trasler,J.M., Hales,B.F. & Robaire,B. Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol Reprod* **34**, 275-283 (1986).
93. Trasler,J.M., Hales,B.F. & Robaire,B. A time-course study of chronic paternal cyclophosphamide treatment in rats: effects on pregnancy outcome and the male reproductive and hematologic systems. *Biol Reprod* **37**, 317-326 (1987).
94. Hellwig,J., Gembardt,C. & Jasti,S. Tetrahydrofuran: two-generation reproduction toxicity in Wistar rats by continuous administration in the drinking water. *Food Chem Toxicol* **40**, 1515-1523 (2002).
95. Neeper-Bradley,T.L. & Ballantyne,B. Two-generation reproduction study by dosing with glutaraldehyde in the drinking water of CD rats. *J Toxicol Environ Health A* **61**, 107-129 (2000).

96. Hellwig,J., Gemhardt,C. & Murphy,S.R. Acrylic acid: two-generation reproduction toxicity study in Wistar rats with continuous administration in the drinking water. *Food Chem Toxicol* **35**, 859-868 (1997).
97. Parent,R.A., Caravello,H.E. & Hoberman,A.M. Reproductive study of acrolein on two generations of rats. *Fundam. Appl Toxicol* **19**, 228-237 (1992).
98. Rusch,G.M. *et al.* Inhalation teratology and two-generation reproduction studies with 1,1-dichloro-1-fluoroethane (HCFC-141b). *Food Chem Toxicol* **33**, 285-300 (1995).
99. Bevan,C. *et al.* Two-generation reproduction toxicity study with isopropanol in rats. *J Appl Toxicol* **15**, 117-123 (1995).
100. Dorman,D.C. *et al.* Fertility and developmental neurotoxicity effects of inhaled hydrogen sulfide in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **22**, 71-84 (2000).
101. Khan,A.T. *et al.* A two-generational reproductive toxicity study of zinc in rats. *J Environ Sci Health B* **42**, 403-415 (2007).
102. Aoyama,H. *et al.* A two-generation reproductive toxicity study of 2,4-dichlorophenol in rats. *J Toxicol Sci* **30 Spec No.**, 59-78 (2005).
103. Exon,J.H., Henningsen,G.M., Osborne,C.A. & Koller,L.D. Toxicologic, pathologic, and immunotoxic effects of 2,4-dichlorophenol in rats. *J Toxicol Environ Health* **14**, 723-730 (1984).
104. Chapin,R.E. *et al.* The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicol Sci* **52**, 80-91 (1999).
105. Tyl,R.W. *et al.* Three-generation evaluation of dietary para-nonylphenol in CD (Sprague-Dawley) rats. *Toxicol Sci* **92**, 295-310 (2006).
106. Yamada,T. *et al.* Exposure to 1-bromopropane causes ovarian dysfunction in rats. *Toxicol Sci* **71**, 96-103 (2003).
107. Furuhashi,K. *et al.* Effects of exposure of rat dams to 1-bromopropane during pregnancy and lactation on growth and sexual maturation of their offspring. *Toxicology* **224**, 219-228 (2006).
108. Takeuchi,T. *et al.* Developmental effects of inhalation exposure to 2-bromopropane in rats. *Reprod Toxicol* **18**, 431-437 (2004).
109. Kang,K.S., Li,G.X., Che,J.H. & Lee,Y.S. Impairment of male rat reproductive function in F1 offspring from dams exposed to 2-bromopropane during gestation and lactation. *Reprod Toxicol* **16**, 151-159 (2002).
110. Kim,J.C. *et al.* Effects of prenatal exposure to the environmental pollutant 2-bromopropane on embryo-fetal development in rats. *Toxicology* **196**, 77-86 (2004).
111. Pollard,I. & Claassens,R. Caffeine-mediated effects on reproductive health over two generations in rats. *Reprod Toxicol* **6**, 541-545 (1992).
112. Pollard,I. & Smallshaw,J. Male mediated caffeine effects over two generations of rats. *J Dev Physiol* **10**, 271-281 (1988).
113. Beliles,R.P., Butala,J.H., Stack,C.R. & Makris,S. Chronic toxicity and three-generation reproduction study of styrene monomer in the drinking water of rats. *Fundam. Appl Toxicol* **5**, 855-868 (1985).

114. Cruzan,G. *et al.* Two generation reproduction study of styrene by inhalation in Crl-CD rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **74**, 211-220 (2005).
115. Dalgaard,M., Hossaini,A., Hougaard,K.S., Hass,U. & Ladefoged,O. Developmental toxicity of toluene in male rats: effects on semen quality, testis morphology, and apoptotic neurodegeneration. *Arch Toxicol* **75**, 103-109 (2001).
116. Roberts,L.G., Bevans,A.C. & Schreiner,C.A. Developmental and reproductive toxicity evaluation of toluene vapor in the rat. I. Reproductive toxicity. *Reprod Toxicol* **17**, 649-658 (2003).
117. Roberts,L.G., Nicolich,M.J. & Schreiner,C.A. Developmental and reproductive toxicity evaluation of toluene vapor in the rat II. Developmental toxicity. *Reprod Toxicol* **23**, 521-531 (2007).
118. Lim,G.E., Stals,S.I., Petrik,J.J., Foster,W.G. & Holloway,A.C. The effects of in utero and lactational exposure to chloroform on postnatal growth and glucose tolerance in male Wistar rats. *Endocrine* **25**, 223-228 (2004).
119. Schwetz,B.A., Leong,B.K. & Gehring,P.J. Embryo- and fetotoxicity of inhaled chloroform in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **28**, 442-451 (1974).
120. Thompson,D.J., Warner,S.D. & Robinson,V.B. Teratology studies on orally administered chloroform in the rat and rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol* **29**, 348-357 (1974).
121. Biles,R.W., Schroeder,R.E. & Holdsworth,C.E. Methyl tertiary butyl ether inhalation in rats: a single generation reproduction study. *Toxicol Ind. Health* **3**, 519-534 (1987).
122. Bevan,C. *et al.* Two-generation reproductive toxicity study of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) in rats. *J Appl Toxicol* **17 Suppl 1**, S13-S19 (1997).
123. Zenick,H., Blackburn,K., Hope,E. & Baldwin,D. An evaluation of the copulatory, endocrinologic, and spermatotoxic effects of carbon disulfide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **73**, 275-283 (1984).
124. Saillenfait,A.M., Bonnet,P. & de Ceaurriz,J. Effects of inhalation exposure to carbon disulfide and its combination with hydrogen sulfide on embryonal and fetal development in rats. *Toxicol Lett.* **48**, 57-66 (1989).
125. Aso,S. *et al.* A two-generation reproductive toxicity study of butyl benzyl phthalate in rats. *J Toxicol Sci* **30 Spec No.**, 39-58 (2005).
126. Bakke,J.L., Lawrence,N.L., Robinson,S. & Bennett,J. Endocrine studies in the untreated F1 and F2 progeny of rats treated neonatally with thyroxine. *Biol Neonate* **31**, 71-83 (1977).
127. Biegel,L.B., Cook,J.C., Hurtt,M.E. & O'Connor,J.C. Effects of 17 beta-estradiol on serum hormone concentrations and estrous cycle in female Crl:CD BR rats: effects on parental and first generation rats. *Toxicol Sci* **44**, 143-154 (1998).
128. Biegel,L.B. *et al.* 90-day feeding and one-generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17 beta-estradiol. *Toxicol Sci* **44**, 116-142 (1998).
129. Buelke-Sam,J. *et al.* The selective estrogen receptor modulator, raloxifene: a segment II/III delivery study in rats. *Reprod Toxicol* **12**, 271-288 (1998).
130. Gray,L.E., Jr., Ostby,J.S. & Kelce,W.R. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **129**, 46-52 (1994).

131. Hapon,M.B., Simoncini,M., Via,G. & Jahn,G.A. Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction* **126**, 371-382 (2003).
132. Hoshino,N., Tani,E., Wako,Y. & Takahashi,K. A two-generation reproductive toxicity study of benzophenone in rats. *J Toxicol Sci* **30 Spec No.**, 5-20 (2005).
133. Matsuura,I. *et al.* Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using lindane. *J Toxicol Sci* **30 Spec No.**, 135-161 (2005).
134. Matsuura,I. *et al.* Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using vinclozolin. *J Toxicol Sci* **30 Spec No.**, 163-188 (2005).
135. McIntyre,B.S. *et al.* Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl:CD(SD)BR rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **167**, 87-99 (2000).
136. McIntyre,B.S., Barlow,N.J. & Foster,P.M. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol Sci* **62**, 236-249 (2001).
137. McIntyre,B.S., Barlow,N.J. & Foster,P.M. Male rats exposed to linuron in utero exhibit permanent changes in anogenital distance, nipple retention, and epididymal malformations that result in subsequent testicular atrophy. *Toxicol Sci* **65**, 62-70 (2002).
138. Nagao,T. *et al.* Effect of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod Toxicol* **14**, 513-532 (2000).
139. Nagao,T., Wada,K., Marumo,H., Yoshimura,S. & Ono,H. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod Toxicol* **15**, 293-315 (2001).
140. Ogata,R. *et al.* Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. *J Toxicol Environ Health A* **63**, 127-144 (2001).
141. Omura,M. *et al.* Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. *Toxicol Sci* **64**, 224-232 (2001).
142. Tyl,R.W. *et al.* Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol* **18**, 241-264 (2004).
143. Yamamoto,M. *et al.* Effects of maternal exposure to a low dose of diethylstilbestrol on sexual dimorphic nucleus volume and male reproductive system in rat offspring. *J Toxicol Sci* **30**, 7-18 (2005).
144. York,R.G., Brown,W.R., Girard,M.F. & Dollarhide,J.S. Two-generation reproduction study of ammonium perchlorate in drinking water in rats evaluates thyroid toxicity. *Int J Toxicol* **20**, 183-197 (2001).
145. York,R.G. *et al.* A rat neurodevelopmental evaluation of offspring, including evaluation of adult and neonatal thyroid, from mothers treated with ammonium perchlorate in drinking water. *International Journal of Toxicology* **23**, 191-214 (2004).
146. Marty,M.S., Chapin,R.E., Parks,L.G. & Thorsrud,B.A. Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev. Reprod. Toxicol.* **68**, 125-136 (2003).

147. Beckman,D.A. & Feuston,M. Landmarks in the development of the female reproductive system. *Birth Defects Res B Dev. Reprod. Toxicol.* **68**, 137-143 (2003).
148. Zoeller,R.T., Tan,S.W. & Tyl,R.W. General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Crit Rev Toxicol* **37**, 11-53 (2007).
149. Lemasters,G.K. *et al.* Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: reproductive health in children and adolescents work group summary. *Environ Health Perspect.* **108 Suppl 3**, 505-509 (2000).
150. Pryor,J.L., Hughes,C., Foster,W., Hales,B.F. & Robaire,B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environ Health Perspect.* **108 Suppl 3**, 491-503 (2000).
151. Sadler,T.W. Susceptible periods during embryogenesis of the heart and endocrine glands. *Environ Health Perspect.* **108 Suppl 3**, 555-561 (2000).
152. Gray,L.E., Jr. *et al.* Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl* **29**, 96-104 (2006).
153. Foster,P.M. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl* **29**, 140-147 (2006).
154. Mircea,C.N., Lujan,M.E. & Pierson,R.A. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obstet. Gynaecol. Can.* **29**, 887-902 (2007).
155. James,D.C. Eating disorders, fertility, and pregnancy: relationships and complications. *J Perinat. Neonatal Nurs.* **15**, 36-48 (2001).
156. Ashby,J. & Elliott,B.M. Reproducibility of Endocrine Disruption Data. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **26**, 94-95 (1997).
157. Sharpe,R.M., Fisher,J.S., Millar,M.M., Jobling,S. & Sumpter,J.P. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect.* **103**, 1136-1143 (1995).
158. CSTEE. Opinion of the Scientific committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment 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.
159. European Commission. European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of proceedings from a workshop held in Weybridge, UK, 2-4 December 1996. EUR 17549. 1996. European Commission, DGXII, Brussels, Belgium.
160. Dobbins,L.L., Brain,R.A. & Brooks,B.W. Comparison of the sensitivities of common in vitro and in vivo assays of estrogenic activity: Application of chemical toxicity distributions. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 2608-2616 (2008).
161. Gallegos Saliner,A., Amat,L., Carbó-Dorca,R., Schultz,T.W. & Cronin,M.T.D. Molecular quantum similarity analysis of estrogenic activity. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 1166-1176 (2003).
162. Tong,W., Hong,H., Fang,H., Xie,Q. & Perkins,R. Decision forest: Combining the predictions of multiple independent decision tree models. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 525-531 (2003).
163. Liu,H., Papa,E. & Gramatica,P. QSAR prediction of estrogen activity for a large set of diverse chemicals under the guidance of OECD principles. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1540-1548 (2006).

164. Liu,H., Papa,E., Walker,J.D. & Gramatica,P. In silico screening of estrogen-like chemicals based on different nonlinear classification models. *J. Mol. Graph. Mod.* **26**, 135-144 (2007).
165. Liu,H., Papa,E. & Gramatica,P. Evaluation and QSAR modeling on multiple endpoints of estrogen activity based on different bioassays. *Chemosphere (in press)*, (2007).
166. Hong,H. *et al.* Comparative molecular field analysis (CoMFA) model using a large diverse set of natural, synthetic and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *SAR QSAR Environ. Res.* **14**, 373-388 (2003).
167. Shi,L. *et al.* QSAR models using a large diverse set of estrogens. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **41**, 186-195 (2001).
168. Krishnan,V. & Safe,S. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**, 55-61 (1993).
169. Waller,C.L., Minor,D.L. & McKinney,J.D. Using three-dimensional quantitative structure-activity relationships to examine estrogen receptor binding affinities of polychlorinated hydroxybiphenyls. *Environ. Health Persp.* **103**, 702-707 (1995).
170. Bradbury,S.P., Mekenyan,O.G. & Anley,G.T. Quantitative structure-activity relationships for polychlorinated hydroxybiphenyl estrogen receptor binding affinity: An assessment of conformer flexibility. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1945-1954 (1996).
171. Navas,J.M. *et al.* Structural features of ligands of the aryl hydrocarbon receptor: The case of the polybrominated biphenyl 209 (PBB-209). SETAC Europe 17th Annual Meeting, Porto , - Poster. 2007.
172. Routledge,E.J. & Sumpter,J.P. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 3280-3288 (1997).
173. Schmieder,P., Aptula,A.O., Routledge,E.J., Sumpter,J.P. & Mekenyan,O.G. Estrogenicity of alkylphenolic compounds: A 3-D structure-activity evaluation of gene activation. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 1727-1740 (2000).
174. Jordan,V.C., Mittal,S., Gosden,B., Koch,R. & Lieberman,M.E. Structure-activity relationships of estrogens. *Environ. Health Persp.* **61**, 97-110 (1985).

9 Anhang

Tabelle 27: (Q)SAR-Modelle, die die Wechselwirkung mit Östrogenrezeptoren modellieren

Deskriptoren	Beschreibung	Endpunkt	Datensatz (gesamt)	Statistik	Kommentar	Ref.
Molekulargewicht < 94 oder > 1000 oder keine Ringstruktur	Vorfilter, Substanzen mit diesen Eigenschaften sollen nicht-EDC sein	ER-Bindung	Training: N=232 (NCTR)	keine falsch-negativen	MW 94 (=Phenol) entspricht dem kleinsten möglichen ER-Binder	Hong et al., Fang et al., Shi et al. ^{9 7 15}
H-bond	Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren	östrogene Gen-Expression EC50 [mol/l]	120 aromat. Verbindungen ²⁶	ext. Valid. n=343 Concord.: 70,85% False neg. rate: 15,91%	nHdon = Σ aromat. OH berechnet mit TSAR nHdon = 0 → inaktiv nHdon = 1-5 und $\log K_{ow} > 1,8$ → aktiv	Gallegos Saliner et al., Netzeva et al. ^{31 30}
Quant.-chem.	Frontier atomic charges	ER-Bindung EC50 [mol/l]	12 hydroxyl. PCB	$r^2=0,79$	$pEC50 = -6,46 + 0,51 \log P + 5,65 AF(fHOMO)$	Bradbury at al. ¹²
	HOMO Intramolekulare Distanzen	ER-Bindung	151 div. Verbindungen	10-35% falsch-positiv	Entscheidungsnetz 4 Aktivitätsklassen	Mekenyan et al. ¹³
	Batterie von COREPA Modellen	ER-Bindung	N=645 (CERI)	---	Differenzierung verschiedener Interaktionstypen durch Verwendung verschiedener Deskriptoren (u.a. Nukleophilie, lokale Hydrophobie, stereoelektronische Parameter)	Serafimova et al. ²⁰
	Quantum similarity	ER-Bindung	120 aromat. Verbindungen ²⁶	62-92% Concord.	Ähnlichkeiten der Elektronendichte Substrukturindikatoren (Phenole, Bisphenole, Benzophenone, Flavonoide, Biphenyle)	Gallegos Saliner et al. ¹⁶¹
Hydrophobie	---	---	---	---	keine Werte angegeben, "rather hydrophobic"	Katzenellenbogen ²⁵

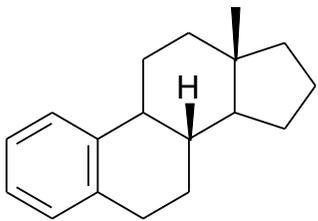
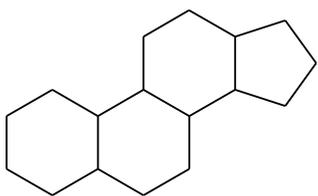
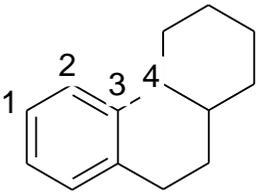
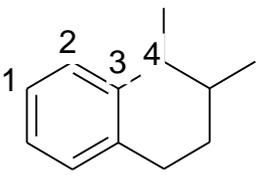
Deskriptoren	Beschreibung	Endpunkt	Datensatz (gesamt)	Statistik	Kommentar	Ref.
	log K_{OW}	ER-Bindung	N=232 (NCTR)	---	Aktiv wenn phenolische Ringstruktur und log K_{OW} > 1,485 Inaktiv wenn keine phenolische Ringstruktur und log K_{OW} < 4,655 weitere Differenzierung anhand von Deskriptoren zur Geometrie (Breite) und Oberflächenladungen	Tong et al. ⁸
Stabilität	---	---	---	---	keine Werte angegeben: "resistant to metabolic degradation"	Katzenellenbogen ²⁵
3-D	Pharmakophore	ER-Bindung	N=232 (NCTR)	---	3-D Similarities in - Hbond-Akzeptor - hydrophobe Zentren - aromatische Zentren - "Shape constraints" verwendet in Verbindung mit anderen Modellen des EPA 4-Stufen Systems	Tong et al., Shi et al. ^{16 15}
Diverse Deskriptoren	88 von 202 Deskriptoren in 7 Entscheidungsbäumen	ER-Bindung	Training: N=232 (NCTR) Validation: 2000x leave 77 (1/3) out	> 98% 78% Concord.	Entscheidungswald (lineare Kombination der Wahrscheinlichkeiten aus 7 Entscheidungsbäumen) > 98% Concordanz für sehr hohe/niedrige Wahrscheinlichkeit, 78% bei Wahrscheinlichkeit 0,3-0,7	Tong et al. ¹⁶²
	(a) 79 Deskript. in 6 Entscheidungsbäumen (b) 138 Deskript. in 4 Entscheidungsbäumen	ER-Bindung	(a) N=232 (NCTR) (b) N=1092 div. Lit.-daten	91-97%	Verfahren siehe ¹⁶² , zusätzlich domain extrapolation	Tong et al. ¹⁷

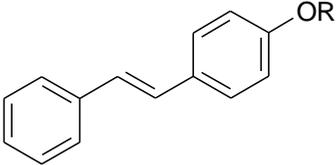
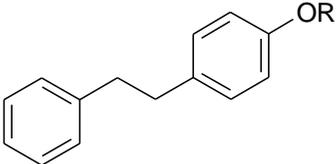
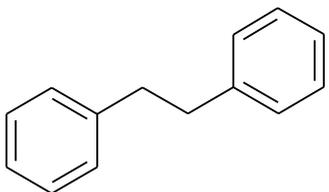
Deskriptoren	Beschreibung	Endpunkt	Datensatz (gesamt)	Statistik	Kommentar	Ref.
	8 topologische Deskriptoren	ER-Bindung	N=128 (NCTR) 4 Outlier eliminiert	$r^2=0,824$ $q^2=0,78-0,79\%$	Deskriptoren beschreiben Größe, Verzweigung, Polarität	Liu et al. ¹⁶³
	3 topologische Deskriptoren + 1 Substruktur (phenol. -OH)	ER-Bindung	N=232 (NCTR) Ext. Valid.: N=87 ¹⁶¹	83-89% Concord. 4-9% falsch-negativ	wichtigster Deskriptor: Substruktur (phenol. -OH) verschiedene Klassifizierungsverfahren sind ~ gleichwertig	Liu et al. ¹⁶⁴
	4 topologische Deskriptoren	ER-Bindung	N=28 EAI (Index aus multipl. Endpunkten)	$r^2=0,899$ $q^2=0,831-0,854\%$	EAI=PC1-Score der multiplen Biotests	Liu et al. ¹⁶⁵

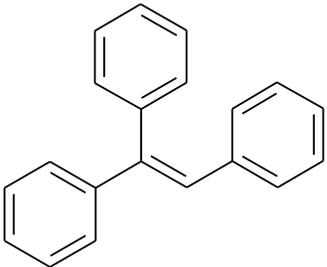
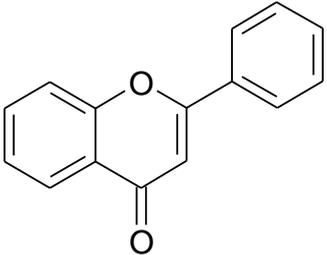
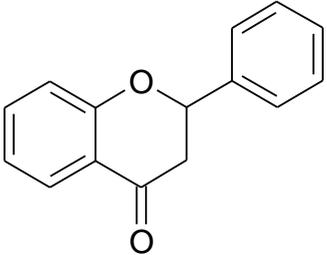
Tabelle 28: (Q)SAR-Modelle, die die Wechselwirkung mit Androgenrezeptoren modellieren

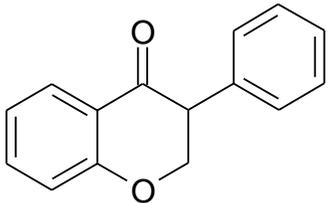
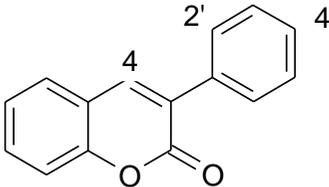
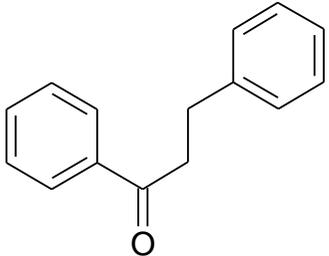
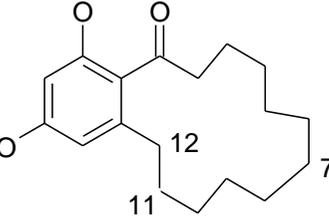
Strukturmerkmal	Beschreibung	Endpunkt	Datensatz (gesamt)	Statistik	Kommentar	Ref.
3-D	CoMFA Similarity	AR-Bindung	N=146 diverse Strukturen	$r^2=0,902$	nicht zum Screening geeignet	Hong et al. ¹⁶⁶
	CoMFA	AR-Bindung	N=13-49	$r^2=0,825-0,983$ $q^2=0,091-0,555$	nicht zum Screening geeignet	Tamura et al. ²⁹
Quant.-chem.	COREPA	kompetitive Rezeptorbindung	11 Steroide und 17 Nicht-Steroide	---	paarweise Ähnlichkeit der bes. aktiven bzw. inaktiven Substanzen	Bradbury et al. ¹²

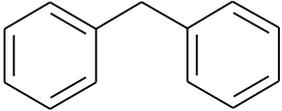
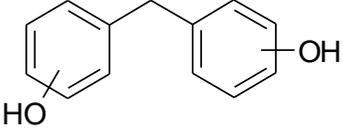
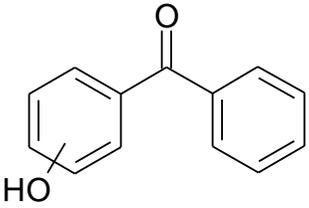
Tabelle 29: Strukturmerkmale, die eine Wechselwirkung mit Östrogenrezeptoren ermöglichen. M_G: Strukturmerkmal "Grundgerüst", M_S: Strukturmerkmal "Substruktur"

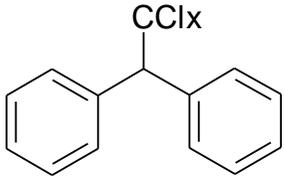
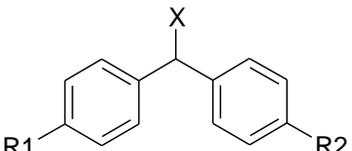
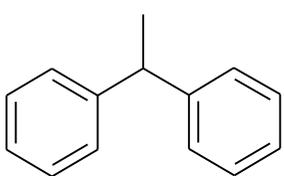
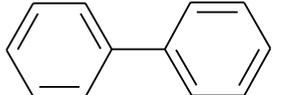
Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
Steroide									
	▼		s.a. 01: Steroidgrundgerüst mit beliebiger Anordnung von Doppelbindungen	Steroid-Grundgerüst (mit aromat. A Ring)	ER-Bindung	stark	Training: N=232 (NCTR)	Steroid-Grundgerüst von 17β-Östradiol	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 01 Steroidgrundgerüst mit beliebiger Anordnung von Doppelbindungen	Steroid-Grundgerüst	ER-Bindung	---	Training: N=232 (NCTR)	jede Art von Bindung	Hong et al. ⁹
	▼		s.a. 02 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	Steroid-Grundgerüst	ER-Bindung	---	div. Lit.-Daten Statistik: r ² =0,96 Sens. 100% Spec. NA	C1, C2: aromat. C C3: Übergang aromat., gesättigter Ring C4: aliphat. C	Klopman & Chakravati ¹⁹
	▼		s.a. 03 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	Steroid-Grundgerüst	ER-Bindung	---	div. Lit.-Daten	C1, C2: aromat. C C3: Übergang aromat., gesättigter Ring C4: aliphat. C	Klopman & Chakravati ¹⁸

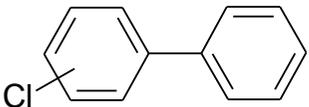
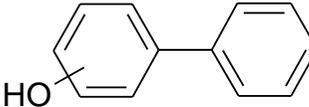
Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
DES									
	▼		s.a. 04 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	DES-Grundgerüst	ER-Bindung	stark	Training: N=232 (NCTR)	DES hat an beiden Ringen p-OH R ist nicht weiter definiert Ethyl-Substitution der Ethenylbrücke erlaubt	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 05 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	DES-Grundgerüst (Hexestrol-Derivate)	ER-Bindung	stark	Training: N=232 (NCTR)	an einem Ringen p-OH oder p-OR R ist nicht weiter definiert Methyl-, Ethyl-Substitution der Ethylbrücke erlaubt	DSSTox ²⁷
	▼		s.a.6	DES-Grundgerüst (auch die meisten Phytoöstrogene ¹⁶⁷)	ER-Bindung	---	Training: N=232 (NCTR)	jede Art von Bindung für Substituenten, Brücke	Hong et al. ⁹
	▼			2 arom. Ringe, die durch 2 C-Atome getrennt sind Beispiel: Steroide + natürl. Östrogene, Diphenylethane	ER RBA %	log RBA %: +2,60 bis -3,67 1 von 5 inaktiv	188 diverse Strukturen davon 100 Binder 88 Nicht-Binder	stärker wirksam als nur 1 Ring oder 2 Ringe die nur durch 1 C-Atom getrennt sind Bindung sowohl von Agonisten als auch Antagonisten	Blair et al. ²⁴

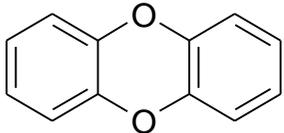
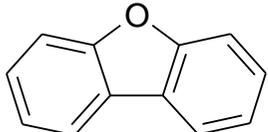
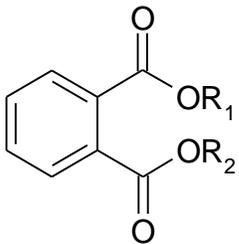
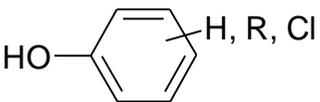
Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
	▼		s.a. 07 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	DES-Grundgerüst (Triphenylethylen-Derivate)	ER-Bindung	stark	Training: N=232 (NCTR)	Antiöstrogene Ethyl- und Alkoxyamin-Substitution erlaubt 4-OH-Substitution erlaubt	DSSTox ²⁷
Phytoöstrogene									
	▼		s.a. 08 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	Phytoöstrogene Flavone	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	enthält DES-Grundgerüst OH-Substitution an einem oder mehreren Ringen erlaubt	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 09 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	Phytoöstrogene Flavanone	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	enthält DES-Grundgerüst OH-Substitution an einem oder mehreren Ringen erlaubt	DSSTox ²⁷

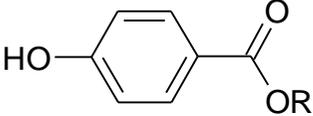
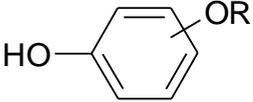
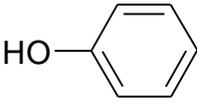
Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
	▼		s.a. 10 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	Phytoöstrogene Isoflavone	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	enthält DES-Grundgerüst eine oder mehrere OH- und OR-Substitution an einem oder mehreren Ringen erlaubt	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 11 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	Phytoöstrogene Coumestane	ER-Bindung	schwach bis moderat	Training: N=232 (NCTR)	enthält DES-Grundgerüst an C4: Ethyl-Substitution oder O-Brücke zu C2' erlaubt an C4': OH- und OCH3-Substitution erlaubt	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 12 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	Phytoöstrogene Chalcanoide	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	sehr ähnlich den Flavanonen p-OH-Substitution an einem oder beiden Ringen erlaubt	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 13 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz), Doppelbindung C11=C12 wird berücksichtigt	Mycoöstrogene	ER-Bindung	schwach bis moderat	Training: N=232 (NCTR)	Doppelbindung C11=C12 erlaubt OH- oder Oxo-Substitution an C7 erlaubt	DSSTox ²⁷

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
				Flavonoide	östrogene Gen-Expression EC50 [mol/l]	8 von 15 inaktiv	120 Aromaten	---	Schultz et al. ²⁶
Diphenylmethane									
	▼		s.a. 14	2 aromat. Ringe die durch 1 C-Atom getrennt sind Beispiel: Bisphenol A Derivate, Benzophenone	ER RBA %	log RBA %: +2,60 bis - 3,67 2 von 8 inaktiv	188 diverse Strukturen davon 100 Binder 88 Nicht- Binder	weniger wirksam als 2 aromat. Ringe, die durch 2 C-Atome getrennt sind Bindung sowohl von Agonisten als auch Antagonisten	Blair et al. ²⁴
	▼		s.a. 14 als konservativer Ansatz	Diphenylmethane Diphenolalkane	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	3. Ring an C-Brücke erlaubt diverse Substituenten an C-Brücke und Phenolringen erlaubt 4-OH erforderlich für Bindung 2,6-Bulk: ↓ Bindungsstärke	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 15 (Benzophenone mit beliebiger Substitution)	Diphenylmethane Benzophenone	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	min. 1 phenol. Ring Carbonyl kann auch Sulfonyl sein diverse OH- und OCH ₃ - Substitution erlaubt	DSSTox ²⁷
	▼			Benzophenone	ER RBA %	3 von 5 inaktiv	188 diverse Strukturen	---	Blair et al. ²⁴

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
	▼			Benzophenone	östrogene Gen-Expression EC50 [mol/l]	8 von 15 inaktiv	120 Aromaten	---	Schultz et al. ²⁶
	▼		s.a. 16 ohne die im Kommentar genannten Einschränkungen (konservativer Ansatz)	Diphenylmethane DDTs	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	CClx (x=2 oder 3) mit Einfach- oder Doppelbindung an C-Brücke diverse OH-, OCH3- und Cl-Substitution erlaubt	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 17 jegliche Substitution erlaubt (konservativer Ansatz)	Methoxychlor-Analoga	ER RBA %	2 von 7 inaktiv	188 diverse Strukturen	-X: =CCl2, -CCl3 R1, R2: H, OH, OMe	Blair et al. ²⁴
	▼		s.a. 17	DDT-Analoga und Bisphenole	ER-Bindung	---	Training: N=232 (NCTR)	OH-, Cl-Subst. an Aromaten Alkyl-, Cl-Subst. an Brücke	Shi et al. ¹⁶⁷
Biphenyle									
	▼		s.a. 18	PCBs	Antiöstrogene in MCF-7 Zellen	---	Cl6, Cl5- und Cl4-PCBs, div. Aroclors	koplanare PCBs sind wirksamer, mono-ortho-koplanare PCBs wirken nur in hohen Konz. Aroclors wirken nicht.	Krishnan & Safe ¹⁶⁸
	▼			PCBs	kompetitive ER-Bindung	---	4 OH-PCBs	nicht-koplanare PCBs (= ortho-Subst.) sind östrogen wirksam	Waller et al. ¹⁶⁹

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
	▼			PCBs	kompetitive ER-Bindung	---	4 OH-PCBs	↑ Bindungsstärke mit: ↑ Größe bei ↓ Verzweigung ↑ HOMO-LUMO-Gap	Bradbury et al. ¹⁷⁰
	▼			PBBs	DR-CALUX	---	2 PCBs 1 PBB	polybromierte Biphenyle können auch am AhR binden, vermutlich in nicht-koplanarer Konformation	Navas et al. ¹⁷¹
	▼			PBBs	ER RBA %	3 von 9 inaktiv	188 diverse Strukturen	---	Blair et al. ²⁴
	▼			Biphenyle	ER RBA %	1 von 3 inaktiv	188 diverse Strukturen	Aktiv: 4-Phenylphenol, 3-Phenylphenol Inaktiv: 2-Phenylphenol	Blair et al. ²⁴
	▼			Biphenyle	östrogene Gen-Expression EC50 [mol/l]	3 von 21 inaktiv	120 Aromaten	---	Schultz et al. ²⁶
	▼		s.a. 19 auch ohne OH-Substitution (konservativer Ansatz)	Biphenyle (polychloriert)	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	≥1 Cl-Substituent OH-Substitution erlaubt 4-OH erforderlich für Bindung	DSSTox ²⁷
	▼		s.a. 20	Biphenyle (nicht-chloriert)	ER-Bindung	schwach	Training: N=232 (NCTR)	min. 1 phenol. Ring	DSSTox ²⁷

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
Dioxine, Furane									
	▼		s.a. 21	Dibenzodioxine	Antiöstrogene in MCF-7 Zellen	---	Cl ₅ -dibenzo-dioxine	größte Wirkung bei 4 lateralen Cl (Pos. 2,3,7,8)	Krishnan & Safe ¹⁶⁸
	▼		s.a. 22	Dibenzofurane	Antiöstrogene in MCF-7 Zellen	---	Cl ₄ und Cl ₅ dibenzo-furane	größte Wirkung bei 4 lateralen Cl (Pos. 2,3,7,8)	Krishnan & Safe ¹⁶⁸
Phthalate									
	▼		s.a. 23	Phthalate	ER RBA %	8 von 8 inaktiv	188 diverse Strukturen	Phthalate binden am AR, aber nicht am ER!	Blair et al. ²⁴
Phenole									
	▼	▼	Alle Phenole warden mittels s.a. 26 erfasst: Phenolgrundkörper	Alkylphenole	ER-Bindung	sehr schwach	Training: N=232 (NCTR)	diverse Cl- oder Alkyl-Substitution erlaubt ↑ Bindungsstärke mit ↑ log K _{OW} (para-subst.), Maximum bei C9	DSSTox ²⁷
	▼	▼		Alkylphenole	ER RBA %	3 von 21 inaktiv	188 diverse Strukturen	diverse Cl- oder Alkyl-Substitution Inaktiv: 2-Ethylphenol, Eugenol, Isoeugenol	Blair et al. ²⁴

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
	▼	▼	s.a. 24	Parabene	ER-Bindung	sehr schwach	Training: N=232 (NCTR)	para-Substitution zwingend ↑ Bindungsstärke mit ↑ log K _{ow}	DSSTox ²⁷
	▼	▼		Parabene	ER RBA %	0 von 7 inaktiv	188 diverse Strukturen	---	Blair et al. ²⁴
	▼	▼	s.a. 25	Alkoxyphenole	ER-Bindung	sehr schwach	Training: N=232 (NCTR)	diverse Alkoxy-Substitution	DSSTox ²⁷
		▼		Phenolische Ringstruktur	---	---	---	keine ortho-Substitution, in meta- para-: bulky, hydrophobe Substitution	Katzenellenbogen ²⁵
		▼		Phenolische Ringstruktur	ER-Bindung	---	Training: N=232 (NCTR)	keine Angaben zu weiteren Bindungen	Hong et al. ⁹
		▼		Phenolische Ringstruktur	ER RBA %	---	188 diverse Strukturen	↑ Bindungsstärke mit ↑ Kettenlänge (Max. bei ~ C8)	Blair et al. ²⁴
		▼		Phenolische Ringstruktur	östrogene Gen-Expression EC50 [mol/l]	---	29 Alkylphenole	↑ Bindungsstärke mit: ↑ Kettenlänge (≥3, max. 8) ↑ Verzweigung ↑ ortho → meta → para	Routledge & Sumpter ¹⁷²

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
		▼		Phenolische Ringstruktur	östrogene Gen-Expression EC50 [mol/l]	---	29 Alkylphenole ¹⁷²	Decision trees: Lmax (~Kettenlänge) Abstand O_C(sp ³) (~Verzweigung) LUMO (~bevorzugt para-Subst.)	Schmieder et al. ¹⁷³
		▼		Phenolische Ringstruktur	östrogene Gen-Expression EC50 [mol/l]	---	120 aromat. Verbindungen	p-Substitution: hydrophob, >3 Atome	Schultz et al. ²⁶
		▼		Phenolische Ringstruktur	ER-Bindung	---	div. Lit.-Daten Statistik: r ² =0,90 Sens. 99% Spec. 77%	keine ortho-Substitution, max. 1 meta-Substituent, para-Substituent erlaubt alternativ können auch 1 oder 2 OH- oder Cl- in ortho sein Modulatoren: ↑ Bindungsstärke mit: ↑ K _{ow} , 2. OH in 12,8 Å Abstand	Klopman & Chakravarti ¹⁹
		▼		Phenolische Ringstruktur	ER-Bindung	---	div. Lit.-Daten	keine ortho-Substitution, max. 1 meta-Substituent, para-Substituent erlaubt; alternativ: 2 meta-Substituenten und/oder 1 para-Substituent	Klopman & Chakravarti ¹⁸
		▼		Phenolische Ringstruktur	Diverse	---	div. Lit.-Daten	keine ortho-Alkyl-Substitution	Jordan et al. ¹⁷⁴

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
Diverse Strukturen									
---				Pestizide	ER RBA %	18 von 19 inaktiv	188 diverse Strukturen	Aktiv: Kepone Inaktiv: 2,4,5-T, 2,4-D, α-Chlordane, Alachlor, Aldrin, Atrazin, Carbaryl, Carbofuran, Dieldrin, Endosulfan, Heptachlor, Hexachlorbenzol, Lindan, Metolachlor, Mirex, Prometon, Simazin, Vinclozolin	Blair et al. ²⁴
				“miscellaneous compounds“	ER RBA %	---	188 diverse Strukturen	Inaktiv: sämtliche getesteten - Säuren (N=4) - Alkohole (N=4) - Aldehyde (N=3) - Amine (N=5) - Kohlenwasserstoffe (N=6) Aktiv: - 2 von 5 Ethern/Ester (4-Heptyloxyphenol, 4-Benzyloxy-phenol) - 4 von 11 “Anderen“ (Aurin, Nordihydroguaiaretsäure, Phenolrot, Phenolphthalein)	Blair et al. ²⁴

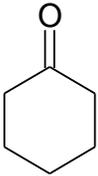
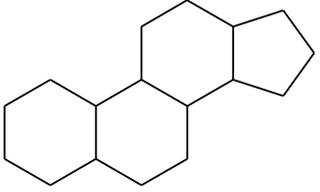
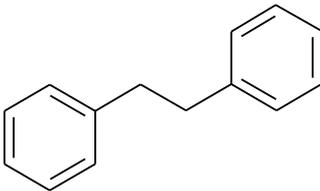
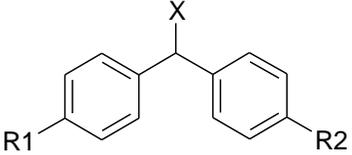
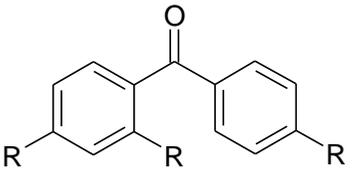
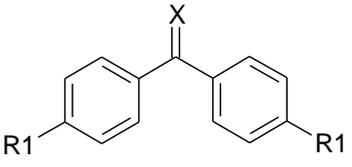
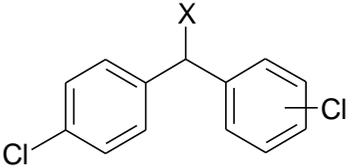
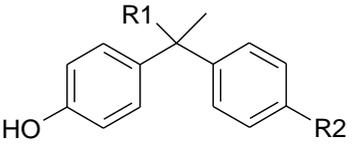
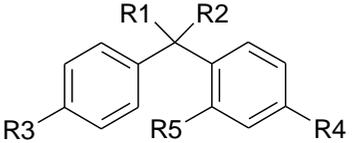
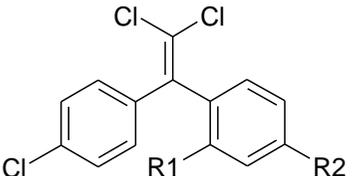
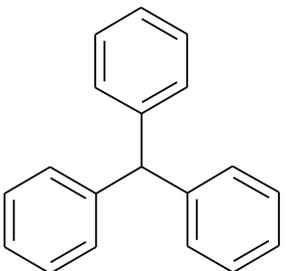
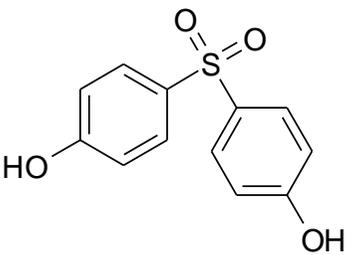
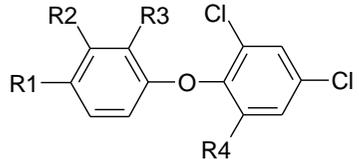
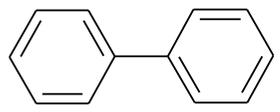
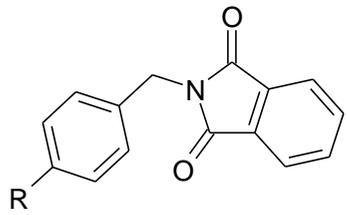
Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural Alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
andere Substrukturen									
			s.a. 27	Ketonische Carbonylfunktion	ER-Bindung	---	div. Lit.-Daten	keine ortho-Substitution, max. 1 meta-Substituent, para-Substituent erlaubt	Klopman & Chakravarti ¹⁸
		▼	Wird nicht als structural alert verwendet, siehe Kommentar	Einzelner aromatischer Ring	ER RBA %	log RBA %: +2,60 bis -3,67	188 diverse Strukturen davon 100 Binder 88 Nicht-Binder	weniger wirksam als 2 aromat. Ringe, die durch 2 C-Atome getrennt sind Beispiel: Alkylphenole, Phthalate, Parabene Bindung sowohl von Agonisten als auch Antagonisten	Blair et al. ²⁴
		▼		Ringstruktur	östrogene Gen-Expression EC50 [mol/l]	---	120 aromat. Verbindungen	Ringe ohne OH sind unwirksam	Schultz et al. ²⁶

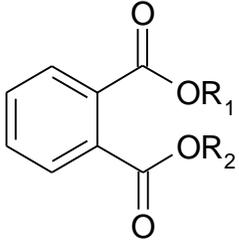
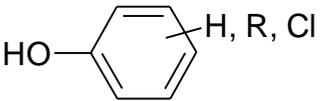
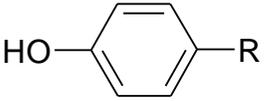
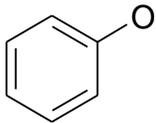
Tabelle 30: Strukturmerkmale, die eine Wechselwirkung mit Androgenrezeptoren ermöglichen.
M_G: Strukturmerkmal "Grundgerüst", M_S: Strukturmerkmal "Substruktur"

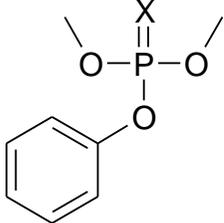
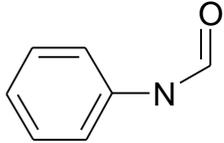
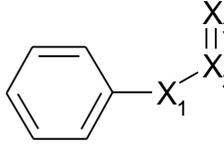
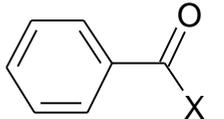
Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
Steroide									
	▼		s.a. 01	Steroid-Grundgerüst	AR-Bindung	---	202 diverse Strukturen	androgene und östrogene Steroide binden an AR Unterschied: 3-Keto am A-Ring: eher AR-Bindung 3-OH am A-Ring: eher ER-Bindung	Fang et al. ²⁸
DES									
	▼		s.a. 05	DES-Grundgerüst	AR-Bindung	---	202 diverse Strukturen	DES-Analoga binden an AR und ER Unterschied: 3-Keto am A-Ring: eher AR-Bindung 3-OH am A-Ring: eher ER-Bindung	Fang et al. ²⁸
Phytoöstrogene									
Strukturen siehe Tabelle 1	▼			Flavone Flavanone Isoflavone Coumestane Chalcanoide Mycoöstrogene	AR-Bindung	3 von 17 inaktiv	202 diverse Strukturen	↑ Bindungsstärke mit ↑ log <i>K</i> _{OW} Nichtbinder haben sehr niedrigen log <i>K</i> _{OW} <u>Inaktiv:</u> Coumestrol, 7-Hydroxyflavon, Naringin	Fang et al. ²⁸

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
Diphenylmethane									
	▼		s.a. 17	Methoxychlor-Analoga	AR-Bindung	0 von 5 inaktiv	202 diverse Strukturen	-X: =CCl ₂ , -CCl ₃ R1, R2: OH, OMe	Fang et al. ²⁸
	▼		s.a. 15	Benzophenone	AR-Bindung	0 von 4 inaktiv	202 diverse Strukturen	R: H, OH	Fang et al. ²⁸
	▼		s.a. 15	Benzophenone	AR-Bindung	0 von 4 inaktiv 2 von 4: Agonisten	N=66 (SPEED 98)	X: O, CH ₂ R1: H, Cl, OH	Tamura et al. ²⁹
	▼		s.a. 17	DDT-Analoga	AR-Bindung	0 von 6 inaktiv	202 diverse Strukturen	X: =CCl ₂ , -CHCl ₂ , -CCl ₃ 2. Ring: Cl in o- oder p-	Fang et al. ²⁸
	▼		s.a. 17	Bisphenole	AR-Bindung	0 von 3 inaktiv	202 diverse Strukturen	R1: Methyl oder Ethyl R2: H, OH	Fang et al. ²⁸

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
	▼		s.a. 17	DDT-Analoga und Bisphenole	AR-Bindung	0 von 11 inaktiv	N=66 (SPEED 98)	R1: H, OH, CH ₃ R2: CCl ₂ , CCl ₃ , C(O)O-Alkyl, 3-Pyrimidin, CH ₃ R3: Cl, Br, OCH ₃ , OH R4: H, Cl, Br, OCH ₃ , OH R5: H, Cl	Tamura et al. ²⁹
	▼		s.a. 16	DDE-Analoga	AR-Bindung	0 von 2 inaktiv	N=66 (SPEED 98)	R1: H, Cl R2: H, Cl	Tamura et al. ²⁹
		▼	s.a. 28	Triphenylmethane	AR-Bindung	2 von 3 inaktiv	202 diverse Strukturen	<u>Aktiv:</u> Aurin <u>Inaktiv:</u> Phenolrot, Phenolphthalein	Fang et al. ²⁸
	▼		s.a. 29	Sulfonyldiphenol	AR-Bindung	0 von 1 inaktiv	202 diverse Strukturen	Gelisted unter: "andere Substanzen"	Fang et al. ²⁸

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
Diphenylether									
	▼		s.a. 30	Diphenylether	AR-Bindung	0 von 5 inaktiv 3 von 5: Agonisten	N=66 (SPEED 98)	R1: Cl, NO ₂ R2: H, CH ₃ O, C(O)OCH ₃ R3: H, Cl R4: H, Cl	Tamura et al. ²⁹
Biphenyle									
	▼		s.a. 18	PCBs	AR-Bindung	1 von 6 inaktiv	202 diverse Strukturen	Substituenten : H, OH, Cl	Fang et al. ²⁸
Isoindole									
	▼		s.a. 31	Isoindole	AR-Bindung	0 von 3 inaktiv	202 diverse Strukturen	R: H, NO ₂ , OH	Fang et al. ²⁸
Kohlenwasserstoffe (aromat.)									
---	▼			Aromaten	AR-Bindung	6 von 7 inaktiv	202 diverse Strukturen	<u>Aktiv:</u> Triphenylethylen <u>Inaktiv:</u> Sec-Butylbenzol, n-Butylbenzol, 1,6-Dimethyl-naphthalin, Diphenylbutadien, Chrysen, Triphenylpropan	Fang et al. ²⁸
---	▼			PAK	AR-Bindung	1 von 7 inaktiv 4 von 6: Agonisten	N=66 (SPEED 98)	<u>Aktiv (Agonist):</u> Benz[a]pyren, Perylen, Chrysen, Phenanthren <u>Aktiv (Antagonist):</u> Pyren, Antracen <u>Inaktiv:</u> Naphtalin	Tamura et al. ²⁹

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
Phthalate									
	▼		s.a. 23	Phthalatester	AR-Bindung	1 von 7 inaktiv	202 diverse Strukturen	R1, R2: Alkyl <u>Inaktiv:</u> bis(2-Ethylhexyl)-phthalat	Fang et al. ²⁸
	▼			Phthalatester	AR-Bindung	0 von 5 inaktiv	N=66 (SPEED 98)	AR-Antagonisten R1, R2: Alkyl	Tamura et al. ²⁹
Phenole									
	▼		s.a. 26	Alkylphenole, Parabene, Alkoxyphenole	AR-Bindung	5 von 19 inaktiv	202 diverse Strukturen	↑ Bindungsstärke mit ↑ log K _{OW} Nichtbinder haben sehr niedrigen log K _{OW} <u>Inaktiv:</u> Vanillin, Phenol, Methylparaben, 2.Chlorphenolo, 4-Ethylphenol	Fang et al. ²⁸
	▼		s.a. 26	Alkylphenole	AR-Bindung	1 von 7 inaktiv	N=66 (SPEED 98)	p-Alkylphenole (pentyl- bis nonyl); 2,4-Cl2-Phenol: sehr geringe Wirksamkeit	Tamura et al. ²⁹
		▼	s.a. 26	Phenolartige Substanzen	AR-Bindung	2 von 6 inaktiv	202 diverse Strukturen	<u>Aktiv:</u> 1-Methoxy-4-[1-propylphenyl]benzol, Carbaryl, Nordihydroguaia-retsäure, 4-(3,5-Diphenylcyclohexyl)phenol, <u>Inaktiv:</u> 2,6-Dihydroxyantha-chinon, 2-Naphthol	Fang et al. ²⁸

Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
		▼		Aromat. Phosphorsäureester	AR-Bindung	0 von 3 inaktiv	202 diverse Strukturen	<u>Aktiv:</u> Methylparathion, Ethylparathion, Triphenylphosphat	Fang et al. ²⁸
Flutamide									
	▼		s.a. 36	Flutamide	AR-Bindung	1 von 9 inaktiv	202 diverse Strukturen	↑ Bindungsstärke mit ↑ e-ziehenden Substituenten am Ring Nichtbinder haben e-liefernde Substituenten am Ring <u>Inaktiv:</u> p-Lactophenetid	Fang et al. ²⁸
		▼	s.a. 36	“miscellaneous compounds“	AR-Bindung	1 von 8 inaktiv 2 von 7: Agonisten	N=66 (SPEED 98)	7 der 8 Verbindungen haben eine gemeinsame Substruktur (mit X ₁ : N, O, C, X ₂ =X ₃ : C=O, P=S, am Ring: 1 bis 2 m-, p-Subst.): Flutamid, Linuron, Fenitrothion, Ethyl-Parathion, Vinclozolin, Procymidon, Iprodion (inaktiv), Ausnahme mit anderer Struktur: Octachlorstylen (aktiv)	Tamura et al. ²⁹
Aromatische Säuren									
		▼		Aromat. Säuren, Amide, Ester	AR-Bindung	4 von 6 inaktiv	202 diverse Strukturen	X: O, N Ringsubstituenten: NH ₂ , OH, O-Alkyl <u>Aktiv:</u> 4-Aminobutylbenzoat, 4-Heptyloxybenzoesäure	Fang et al. ²⁸

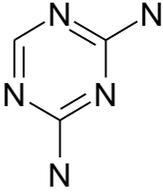
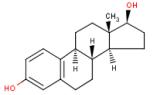
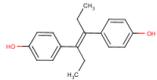
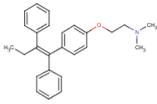
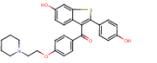
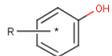
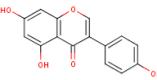
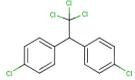
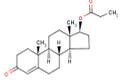
Strukturmerkmal	M _G	M _S	Structural alert	Beschreibung	Endpunkt	Bindungsstärke	Datensatz (gesamt)	Kommentar	Ref.
Triazine									
		▼	s.a. 33	Triazine	AR-Bindung	3 von 3 inaktiv	202 diverse Strukturen	<u>Inaktiv:</u> Simazin, Atrazin, Prometon	Fang et al. ²⁸
Diverse Strukturen									
---				Organochlorverbindungen	AR-Bindung	3 von 10 inaktiv	202 diverse Strukturen	<u>Aktiv:</u> 2,4,5-T, γ-Hexachlor-cyclohexan, Aldrin, Endosulfan, Heptachlor, Kepone, Chlordane <u>Inaktiv:</u> 2,4-D, Hexachlorbenzol, Mirex	Fang et al. ²⁸
---				Organochlorverbindungen	AR-Bindung	11 von 17 inaktiv	N=66 (SPEED 98)	<u>Aktiv:</u> Dieldrin, Endrin, Aldrin, Toxaphen, γ-Hexachlorcyclohexan, trans-Heptachlorepoxyd <u>Inaktiv:</u> Heptachlor, trans-Nona-chlor, Chlordan, trans-Chlordan, cis-Chlordan, Oxychlordan, Chlordecon, Mirex, β-Hexachlor-cyclohexan, Hexachlorbenzol, cis-Heptachlorepoxyd	Tamura et al. ²⁹
---				Nichtcyclische Verbindungen	AR-Bindung	8 von 10 inaktiv	202 diverse Strukturen	<u>Aktiv:</u> Diisobutyladipat, Dibutyladipat	Fang et al. ²⁸
---				Siloxane	AR-Bindung	1 von 3 inaktiv	202 diverse Strukturen	<u>Aktiv:</u> 1,3-Diphenyltetramethyl-disiloxan, Triphenylsilanol <u>Inaktiv:</u> 1,3-Dibenzyltetra-methylidisiloxan	Fang et al. ²⁸

Tabelle 31: Falsch-negativ erkannte Stoffe, die als "aktiv" charakterisiert wurden. (1 = hohe Aktivität, 5 = keine oder sehr schwache Aktivität)

Name	FDA androgen	FDA Östrogen	androgen	Anti-androgen	Anti-östrogen	Östrogen	Rezeptorbindung AR	Rezeptorbindung ER	Höchste Klasse
4:2 FTOH (1-Hexanol, 3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluoro-; fluorotelomer alcohol)					1	5			1
2,4,6-Tribromophenol (2,4,6-TBP)			5	1	4	5			1
Homosalate (3,3,5-Trimethylcyclohexyl salicylate, HMS)			5	2	5	5			2
Coumestrol	5	3				2			2
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (Benzophenone-3, Bp-3)		5	5	2	5	3	5	5	2
1,1,4,4-Tetramethyl-6-ethyl-7-acetyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (AETT)			5	2	5	5			2
Cypermethrin (Pyrethroid)			5	2	3	5		5	2
Linuron	4			2					2
3-OH-B[b]PH[2,3-d]T						5		3	3
Deltamethrin				5	3	5		5	3
Fenvalerate (Pyrethroid)			5	3	3	5		5	3
3-Phenoxybenzoic acid (3-PBA), Metabolit			5	3					3
PFOA, Perfluorooctanoic acid					5	3			3
Octachlorostyrene				3					3
1,1'-Diphenylethene				3					3
Bis(2-hydroxyphenyl)methane (Bisphenol F)		5	5	3		5	5	5	3
2,4-Dichlorophenol				3					3
4-Diethylaminobenzaldehyde				5			3		3
Anthracene			5	3					3
Benzophenone	4			3					3
Vinclozolin M1				3					3
Sumithrin (Pyrethroid)					3	4		5	3
Tetramethrin (Pyrethroid)					3			5	3
3-OH-B[b]N[2,1-d]T						3		3	3
a,a-Dimethyl-b-ethyl allenolic acid								3	3
Permethrin (Pyrethroid)			5	3	3	5		5	3
Vinclozolin M2			4	3					3

Neburon				3					3
B-MDM, 4-tert-Butyl-4'-methoxy-dibenzoylmethan (UV-Filter)			5	3	5	5		5	3
6:2 FTOH, Perfluorooctanol					5	3			3
trans-Chlorden (beta Chlordene)				3					3
Allethrin (Bioallethrin)					3	5		5	3
lindane (gamma-HCH)	4	5		3				5	3
2-tert-Butylantraquinone			3				5		3
Phenol, 4-chloro-2-methyl-	4	5							4
3,4-DIPHENYLTETRAHYDROFURAN	4								4
1-Hydroxy-2-methoxy-4-propen-1-yl benzene (Isoeugenol, mixture of cis and trans)	4	5						5	4
2,2'-Methylenebis(4-chlorophenol)		4						5	4
n-Butyl p-aminobenzoate	4	5						5	4
4,4'-Dichlorobenzophenone				4					4
Di-i-butyl adipate	4								4
Isoprothiolane						4			4
P-HEPTYLOXYBENZOIC ACID	4								4
Dibutyl adipate	4								4
aurin	4	4						5	4
FENPICIONIL	4								4
Propanil	4								4
metolachlor	4	5						5	4
Flutolanil						4			4
2-sec-butylphenol	4	5						5	4

Tabelle 32: Modellsubstanzen zur Evaluierung endokriner Effekte

Name	Struktur	Zielstruktur	Anwendung/Vorkommen	Bemerkung
17-beta-Estradiol		Östrogenrezeptor	physiologisches Hormon	
Diethylstilbestrol		Östrogenrezeptor	Pharmakon	nicht mehr eingesetzt
Tamoxifen		Östrogenrezeptor	Pharmakon	
Raloxifen		Östrogenrezeptor	Pharmakon	
Nonylphenol		Östrogenrezeptor	Industriechemikalie (Tenside, Weichmacher)	
Genistein		Östrogenrezeptor Aromatase (Enzymhemmer)	Phytoöstrogen	
p,p'-DDT		Östrogenrezeptor Androgenrezeptor	Insektizid	antiandrogen wirkender Metabolit p,p'-DDE
Testosteronpropionat		Androgenrezeptor	Pharmakon, Anabolikum	

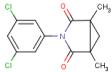
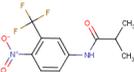
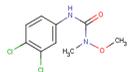
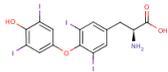
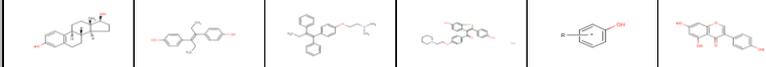
Name	Struktur	Zielstruktur	Anwendung/Vorkommen	Bemerkung
17-beta-Trenbolon		Androgenrezeptor	Masthilfsmittel, Anabolikum	
Vinclozolin		Androgenrezeptor	Fungizid	
Procymidon		Androgenrezeptor	Fungizid	
Flutamid		Androgenrezeptor	Pharmakon	
Finasterid		5-alpha-Reduktase (Enzymhemmer)	Pharmakon	
Linuron		Androgenrezeptor Aromatase (Enzymhemmer)	Herbizid	
Thyroxin		Schilddrüse	physiologisches Hormon	
Propylthio-urazil		Schilddrüse, Peroxidase (Enzymhemmer)	Pharmakon	
Ammonium-perchlorat		Schilddrüse, Jodidtransport (Enzymhemmer)	Treibstoff, Brennstoff	andere Perchlorate als Therapeutika eingesetzt

Tabelle 33: 15 Substanzen zur Parameterevaluierung endokriner Effekte mit vermuteter endokriner Wirkung oder unbekanntem Wirkmechanismus sowie 15 Substanzen mit reproduktionstoxischen Effekten nicht aber endokriner Wirkung (Negativkontrollen)

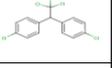
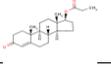
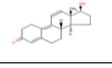
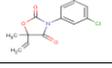
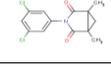
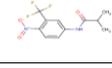
Fraglich endokrin-wirksame Substanzen		
CAS Nr.	Struktur	Name
17924-92-4		Zearalenon
1461-22-9		Tributylzinnchlorid
85-68-7		Butylbenzylphthalat
117-81-7		Di-(2-ethylhexyl)phthalat
58-89-9		Lindan
87-86-5		Pentachlorophenol
80-05-7		Bisphenol A
119-61-9		Benzophenon
120-83-2		Dichlorophenol
84852-15-3		4-Nonylphenol
98-95-3		Nitrobenzen
100-41-4		Ethylbenzen
631-64-1		Dibromessigsäure
106-94-5		1-Bromopropan
75-26-3		2-Bromopropan

Fraglich endokrin-wirksame Substanzen		
CAS Nr.	Struktur	Name
Negativkontrollen		
50-18-0		Cyclophosphamid
58-08-2		Koffein
100-42-5		Styren
108-88-3		Toluen
109-99-9		Tetrahydrofuran
111-30-8		Glutaraldehyd
67-66-3		Chloroform
107-02-8		Acrolein
79-10-7		Acrylsäure
1717-00-6		1,1-Dichloro-1-fluoroethan
1634-04-4		Methyl tertiary butyl Ether
67-63-0		Isopropanol
7783-06-4		Schwefelwasserstoff
7646-85-7		Zinkchlorid
75-15-0		Schwefelkohlenstoff

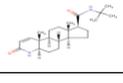
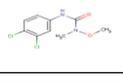
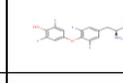
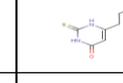
Tabelle 34: Gegenüberstellung der beobachteten Effekte endokriner Substanzen mit bekanntem Wirkmechanismus, endokrin wirksamer Substanzen ohne gesicherten Wirkmechanismus und bekannter reproduktionstoxischer Substanzen ohne endokrine Wirkung an Hand der in OECD Guideline Studien erhobenen Parameter

References Number of studies	endocrine disrupting compounds with known mechanism																																																																																																																																																															
	1	1	1	2	1	1																																																																																																																																																										
References	Biegel, L.B. et al. (1998): Toxicological Sciences 44: 116-142; Biegel, L.B. et al. (1998), Toxicological Sciences 44: 143-154	Yamamoto, M. et al. (2005) Journal of Toxicological Sciences 30(1): 7-18	Yamasaki, K. et al. (2005) Toxicology Letters 156: 289-296	Clarke, D.O. et al. (1998): Reproductive Toxicology 12(3): 247-259; Buelke-Sam, J. et al. (1998): Reproductive Toxicology 12(3): 271-288	Nagas, T. et al. (2001): Reproductive Toxicology 15: 293-315	Delclos, K.B. et al. (2001): Reproductive Toxicology 15: 647-663																																																																																																																																																										
CAS number	50-28-2	56-53-1	10540-29-1	82640-04-8	25154-52-3	446-72-0																																																																																																																																																										
Compound	17-beta Estradiol	Diethylstilbestrol	Tamoxifen	Raloxifene	Nonylphenol	Genistein																																																																																																																																																										
Acting mechanism	potent ER agonist	selective ER agonist and antagonist (SERM)	selective ER agonist and antagonist (SERM)	selective ER agonist and antagonist (SERM)	weak ER agonist	weak estrogen agonist, aromatase inhibitor																																																																																																																																																										
Affected parameter																																																																																																																																																																
general toxicity parameter	<table border="1"> <tr><td>body weight/body weight changes</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td>x</td><td>x</td><td>x</td></tr> <tr><td>weight brain</td><td></td><td></td><td>n</td><td></td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>weight heart</td><td></td><td></td><td>n</td><td></td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>weight kidney</td><td></td><td></td><td>n</td><td></td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>weight liver</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td>x</td></tr> <tr><td>weight spleen</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>n</td></tr> <tr><td>weight thymus</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td>x</td><td>x</td></tr> </table>						body weight/body weight changes	x	x	n	x	x	x	weight brain			n		x		weight heart			n		x		weight kidney			n		x		weight liver	x				x	x	weight spleen	x					n	weight thymus				x	x	x																																																																																																									
body weight/body weight changes	x	x	n	x	x	x																																																																																																																																																										
weight brain			n		x																																																																																																																																																											
weight heart			n		x																																																																																																																																																											
weight kidney			n		x																																																																																																																																																											
weight liver	x				x	x																																																																																																																																																										
weight spleen	x					n																																																																																																																																																										
weight thymus				x	x	x																																																																																																																																																										
mating, fertility, gestation, parturition, lactation	<table border="1"> <tr><td>ovulation rate</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>oestrus cycle length and normality</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>mating index</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>time-to-mating/number of days until mating, precoital interval</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>fertility/fertility index</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>n</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>number/percentage of fertile males</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>number/percentage of pregnant females</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td></td><td>x</td></tr> <tr><td>gestation/gestation index</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>number of corpora lutea</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td></td><td>x</td></tr> <tr><td>number of implantations</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>preimplantation loss</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions</td><td>x</td><td>x</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>gestation length</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td></td><td>x</td></tr> <tr><td>weight gain during gestation</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>signs of prolonged or difficult parturition</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>litter size</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td></tr> <tr><td>number of stillbirths</td><td>n</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td>n</td></tr> <tr><td>number of live births/live fetuses</td><td>x</td><td></td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td>n</td></tr> <tr><td>viability index</td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td>n</td></tr> <tr><td>lactation index</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>milk quantity and quality</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>sex/sex ratio of pups</td><td>n</td><td></td><td>n</td><td>n</td><td>n</td><td>n</td></tr> </table>						ovulation rate							oestrus cycle length and normality	x		n	x	n	x	mating index	x		n	x	n		time-to-mating/number of days until mating, precoital interval	x		n	x	n		fertility/fertility index	x		n	n	n	x	number/percentage of fertile males				x	n		number/percentage of pregnant females	x		n	x		x	gestation/gestation index	x		n	x			number of corpora lutea	x		n	x		x	number of implantations	x		n	x	x		preimplantation loss	x		n	x			resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	x	x	x	x			gestation length	x		n	x		x	weight gain during gestation	x		n	x	n		signs of prolonged or difficult parturition	x		n	x			litter size	x		n	x	x	n	number of stillbirths	n		n	x	n	n	number of live births/live fetuses	x		x	x	n	n	viability index	n	x	n	x	n	n	lactation index							milk quantity and quality							sex/sex ratio of pups	n		n	n	n	n
ovulation rate																																																																																																																																																																
oestrus cycle length and normality	x		n	x	n	x																																																																																																																																																										
mating index	x		n	x	n																																																																																																																																																											
time-to-mating/number of days until mating, precoital interval	x		n	x	n																																																																																																																																																											
fertility/fertility index	x		n	n	n	x																																																																																																																																																										
number/percentage of fertile males				x	n																																																																																																																																																											
number/percentage of pregnant females	x		n	x		x																																																																																																																																																										
gestation/gestation index	x		n	x																																																																																																																																																												
number of corpora lutea	x		n	x		x																																																																																																																																																										
number of implantations	x		n	x	x																																																																																																																																																											
preimplantation loss	x		n	x																																																																																																																																																												
resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	x	x	x	x																																																																																																																																																												
gestation length	x		n	x		x																																																																																																																																																										
weight gain during gestation	x		n	x	n																																																																																																																																																											
signs of prolonged or difficult parturition	x		n	x																																																																																																																																																												
litter size	x		n	x	x	n																																																																																																																																																										
number of stillbirths	n		n	x	n	n																																																																																																																																																										
number of live births/live fetuses	x		x	x	n	n																																																																																																																																																										
viability index	n	x	n	x	n	n																																																																																																																																																										
lactation index																																																																																																																																																																
milk quantity and quality																																																																																																																																																																
sex/sex ratio of pups	n		n	n	n	n																																																																																																																																																										
development of offspring	<table border="1"> <tr><td>number of pups with grossly visible abnormalities</td><td></td><td></td><td>x</td><td></td><td></td><td>n</td></tr> <tr><td>external/internal malformations and variations</td><td></td><td>x</td><td>x</td><td></td><td></td><td>n</td></tr> <tr><td>survival of pups</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>body weight of pups at day 0 or 1</td><td>x</td><td>n</td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>anogenital distance at day 0 or 1</td><td>n</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>n</td><td>n</td></tr> <tr><td>time of hair growth</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>n</td></tr> <tr><td>time of tooth eruption</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td>x</td><td>n</td></tr> <tr><td>time of ear opening</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>time of eye opening</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>Functional development: motor activity</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Functional development: reflex ontogeny</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td>x</td></tr> <tr><td>Functional development: sensory function</td><td></td><td></td><td></td><td>n</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Functional development: learning and memory</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>age at testes descent</td><td></td><td></td><td></td><td>n</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>age and/or body weight at balanopreputal separation</td><td>x</td><td></td><td>x</td><td>n</td><td>n</td><td>n</td></tr> <tr><td>age and/or body weight at vaginal opening</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>x</td><td>x</td></tr> <tr><td>onset of oestrus behaviour (menses)</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>postnatal structural and functional development</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>offspring reproduction</td><td>x</td><td></td><td></td><td>x</td><td>x</td><td></td></tr> </table>						number of pups with grossly visible abnormalities			x			n	external/internal malformations and variations		x	x			n	survival of pups	x	x	n	x	n		body weight of pups at day 0 or 1	x	n	n	x	n	x	weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	x	x	n	x	n	x	anogenital distance at day 0 or 1	n		n	x	n	n	time of hair growth						n	time of tooth eruption				x	x	n	time of ear opening				x	n	x	time of eye opening				x	n	x	Functional development: motor activity							Functional development: reflex ontogeny					x	x	Functional development: sensory function				n			Functional development: learning and memory							age at testes descent				n			age and/or body weight at balanopreputal separation	x		x	n	n	n	age and/or body weight at vaginal opening	x		n	x	x	x	onset of oestrus behaviour (menses)				x			postnatal structural and functional development				x			offspring reproduction	x			x	x															
number of pups with grossly visible abnormalities			x			n																																																																																																																																																										
external/internal malformations and variations		x	x			n																																																																																																																																																										
survival of pups	x	x	n	x	n																																																																																																																																																											
body weight of pups at day 0 or 1	x	n	n	x	n	x																																																																																																																																																										
weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	x	x	n	x	n	x																																																																																																																																																										
anogenital distance at day 0 or 1	n		n	x	n	n																																																																																																																																																										
time of hair growth						n																																																																																																																																																										
time of tooth eruption				x	x	n																																																																																																																																																										
time of ear opening				x	n	x																																																																																																																																																										
time of eye opening				x	n	x																																																																																																																																																										
Functional development: motor activity																																																																																																																																																																
Functional development: reflex ontogeny					x	x																																																																																																																																																										
Functional development: sensory function				n																																																																																																																																																												
Functional development: learning and memory																																																																																																																																																																
age at testes descent				n																																																																																																																																																												
age and/or body weight at balanopreputal separation	x		x	n	n	n																																																																																																																																																										
age and/or body weight at vaginal opening	x		n	x	x	x																																																																																																																																																										
onset of oestrus behaviour (menses)				x																																																																																																																																																												
postnatal structural and functional development				x																																																																																																																																																												
offspring reproduction	x			x	x																																																																																																																																																											
reproductive organs	<table border="1"> <tr><td>weight uterus</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td></td><td>x</td><td>n</td></tr> <tr><td>weight vagina</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>histopathology uterus + vagina</td><td>x</td><td></td><td></td><td>x</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>uterine hyperplasia</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>changes in uterine pathology and cellular growth</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td></td><td>x</td></tr> <tr><td>changes in uterine protein expression</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>labeling index for uterine luminal and glandular epithelium</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>weight ovaries</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td></td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>histopathology ovaries</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>n</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>quantitative analysis of primordial follicles</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>x</td></tr> <tr><td>histopathology oviduct</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>histopathology vagina</td><td></td><td></td><td></td><td>n</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>histopathology mammary gland (male/female)</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>x</td></tr> </table>						weight uterus	x		n		x	n	weight vagina							histopathology uterus + vagina	x			x	n	x	uterine hyperplasia	x						changes in uterine pathology and cellular growth				x		x	changes in uterine protein expression							labeling index for uterine luminal and glandular epithelium	x						weight ovaries	x		n		n		histopathology ovaries	x		n	n	n	x	quantitative analysis of primordial follicles	x					x	histopathology oviduct							histopathology vagina				n			histopathology mammary gland (male/female)	x					x																																																															
weight uterus	x		n		x	n																																																																																																																																																										
weight vagina																																																																																																																																																																
histopathology uterus + vagina	x			x	n	x																																																																																																																																																										
uterine hyperplasia	x																																																																																																																																																															
changes in uterine pathology and cellular growth				x		x																																																																																																																																																										
changes in uterine protein expression																																																																																																																																																																
labeling index for uterine luminal and glandular epithelium	x																																																																																																																																																															
weight ovaries	x		n		n																																																																																																																																																											
histopathology ovaries	x		n	n	n	x																																																																																																																																																										
quantitative analysis of primordial follicles	x					x																																																																																																																																																										
histopathology oviduct																																																																																																																																																																
histopathology vagina				n																																																																																																																																																												
histopathology mammary gland (male/female)	x					x																																																																																																																																																										
Sexual behaviour	<table border="1"> <tr><td>weight testes</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td></td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>histopathology testes</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td></td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>weight epididymides</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td>x</td><td>x</td><td>x</td></tr> <tr><td>histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td>n</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>number of spermatis</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td></td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>sperm morphology</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>sperm motility</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>sperm reserve</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>weight total prostate</td><td>x</td><td>x</td><td>n</td><td></td><td>x</td><td>x</td></tr> <tr><td>weight ventral prostate</td><td>x</td><td></td><td></td><td>n</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>histopathology prostate</td><td>x</td><td></td><td></td><td>n</td><td>n</td><td>x</td></tr> <tr><td>weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCC)</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td></td><td>x</td><td>n</td></tr> <tr><td>histopathology seminal vesicle</td><td>x</td><td></td><td></td><td>n</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>histopathology coagulating gland</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>weight glans penis</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>weight paired Cowper's glands (COW)</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>						weight testes	x		n		n		histopathology testes	x	x	n		n		weight epididymides	x	x	n	x	x	x	histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)	x	x	n	n	n		number of spermatis	x	x	n		n	x	sperm morphology	x				n		sperm motility	x				n		sperm reserve	x				n	x	weight total prostate	x	x	n		x	x	weight ventral prostate	x			n	n	x	histopathology prostate	x			n	n	x	weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCC)	x		n		x	n	histopathology seminal vesicle	x			n	n		histopathology coagulating gland							weight glans penis							weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle							weight paired Cowper's glands (COW)																																									
weight testes	x		n		n																																																																																																																																																											
histopathology testes	x	x	n		n																																																																																																																																																											
weight epididymides	x	x	n	x	x	x																																																																																																																																																										
histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)	x	x	n	n	n																																																																																																																																																											
number of spermatis	x	x	n		n	x																																																																																																																																																										
sperm morphology	x				n																																																																																																																																																											
sperm motility	x				n																																																																																																																																																											
sperm reserve	x				n	x																																																																																																																																																										
weight total prostate	x	x	n		x	x																																																																																																																																																										
weight ventral prostate	x			n	n	x																																																																																																																																																										
histopathology prostate	x			n	n	x																																																																																																																																																										
weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCC)	x		n		x	n																																																																																																																																																										
histopathology seminal vesicle	x			n	n																																																																																																																																																											
histopathology coagulating gland																																																																																																																																																																
weight glans penis																																																																																																																																																																
weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle																																																																																																																																																																
weight paired Cowper's glands (COW)																																																																																																																																																																
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)	<table border="1"> <tr><td>weight adrenals</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td></td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>histopathology adrenals</td><td>x</td><td></td><td></td><td>x</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>weight pituitary</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td>x</td><td>x</td><td>x</td></tr> <tr><td>histopathology pituitary</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>weight thyroid</td><td>x</td><td></td><td>n</td><td></td><td>x</td><td>n</td></tr> <tr><td>histopathology thyroid</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level LH</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td>x</td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level FSH</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td>x</td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level TSH</td><td>x</td><td></td><td></td><td>x</td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level prolactin</td><td>x</td><td></td><td></td><td>x</td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level estradiol</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td>n</td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level progesterone</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level testosterone</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td></td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level DHT</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level T4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td></td></tr> <tr><td>serum hormone level T3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>x</td><td></td></tr> </table>						weight adrenals	x		n		x		histopathology adrenals	x			x	n		weight pituitary	x		n	x	x	x	histopathology pituitary	x						weight thyroid	x		n		x	n	histopathology thyroid	x						serum hormone level LH	x	x		x	x		serum hormone level FSH	x	x		x	x		serum hormone level TSH	x			x	x		serum hormone level prolactin	x			x	n		serum hormone level estradiol	x				n		serum hormone level progesterone	x				x		serum hormone level testosterone	x	x			x		serum hormone level DHT							serum hormone level T4					x		serum hormone level T3					x																																											
weight adrenals	x		n		x																																																																																																																																																											
histopathology adrenals	x			x	n																																																																																																																																																											
weight pituitary	x		n	x	x	x																																																																																																																																																										
histopathology pituitary	x																																																																																																																																																															
weight thyroid	x		n		x	n																																																																																																																																																										
histopathology thyroid	x																																																																																																																																																															
serum hormone level LH	x	x		x	x																																																																																																																																																											
serum hormone level FSH	x	x		x	x																																																																																																																																																											
serum hormone level TSH	x			x	x																																																																																																																																																											
serum hormone level prolactin	x			x	n																																																																																																																																																											
serum hormone level estradiol	x				n																																																																																																																																																											
serum hormone level progesterone	x				x																																																																																																																																																											
serum hormone level testosterone	x	x			x																																																																																																																																																											
serum hormone level DHT																																																																																																																																																																
serum hormone level T4					x																																																																																																																																																											
serum hormone level T3					x																																																																																																																																																											
additional data	additionally liver hypertrophy, dermal changes (atrophy and alopecia), increased pancreas weight, reduced number of lymphocytes, decreased ovarian follicle counts	additionally vaginal bleeding in second trimester of gestation, changes in pup brain morphometry (volume of sexually dimorph nucleus, SDN-POA)	additionally increased maternal mortality during gestation and parturition	additional effect on growth hormone, immunosystem, increased female mortality during parturition, no effect on pup behavioural battery	additionally increased lung weight, liver hypertrophy, no effect on pinna unfolding in pups	additionally no effect on hematology, clinical chemistry, preputial gland weight																																																																																																																																																										

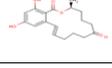
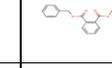
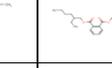
Fortsetzung Tabelle 34

x = adversely influenced n = examined with no effect	endocrine disrupting compounds with known mechanism					
References	Hojo, H. et al. (2006): <i>Congenital Anomalies</i> 46: 105-114	Wolf, C.J. et al. (2002): <i>Toxicological Sciences</i> 65: 71-86; Wolf, C.J., LeBlanc, G.A. & L.E. Gray, Jr. (2004): <i>Toxicological Sciences</i> 78: 135-143	Hotchkiss, A.K. et al. (2007): <i>Toxicology Letters</i> 174: 31-41	Matsuura, I. et al. (2005): <i>Journal of Toxicological Sciences</i> 30: S163-188; Gray, L.E., Ostby, J.S. & W.R. Kelce (1994): <i>Toxicology and Applied Pharmacology</i> 129: 46-52	Ostby, J. et al. (1999): <i>Toxicology and Industrial Health</i> 15: 80-93	McIntyre, B.S., Barlow, N.J. & P.M.D. Foster (2001): <i>Toxicological Sciences</i> 62: 236-249
Number of studies	1	2	1	2	1	2
CAS number	50-29-3	57-85-2	10161-33-8	50471-44-8	32809-16-8	13311-84-7
Compound	p,p'-DDT	Testosterone propionate	17 beta-Trenbolone	Vinclozolin	Procymidone	Flutamide
Acting mechanism	estrogen agonist, parental compound to p,p'-DDE (antiandrogen)	potent AR agonist	potent AR agonist	AR antagonist, possible thyroid modulator	AR antagonist	AR antagonist
						
Affected parameter						
general toxicity parameter						
body weight/body weight changes	x	x	x	x	n	x
weight brain	n			n		
weight heart	x			x		
weight kidney	x	n		x		n
weight liver	x	n		x		n
weight spleen	n			n		
weight thymus	n			n		
mating, fertility, gestation, parturition, lactation						
ovulation rate						
oestrus cycle length and normality	n			n		
matring index	n			x		
time-to-mating/number of days until mating, precoital interval	n			x		
fertility/fertility index	n			x		
number/percentage of fertile males	n			x		
number/percentage of pregnant females	n			x		
gestation/gestation index	n			x		n
number of corpora lutea	n	n		n		
number of implantations	n			n		
preimplantation loss	n			n		
resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	n	x		n		
gestation length	n	x		x		
weight gain during gestation	n	x		x	n	
signs of prolonged or difficult parturition	n			x		x
litter size	n	x	n	n	n	n
number of stillbirths	n	n		n		n
number of five births/live fetuses	n	n		n		n
viability index	n			n		n
lactation index	n			n		n
milk quantity and quality	n			n		n
sex/sex ratio of pups	n			n		n
development of offspring						
number of pups with grossly visible abnormalities	n	x	x	x	x	x
external/internal malformations and variations	x	x	x	x	x	x
survival of pups	n	x	x	n	n	n
body weight of pups at day 0 or 1	n	x	x	x	n	n
weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	n	x	x	x	n	n
anogenital distance at day 0 or 1	x	x	x	x	x	x
time of hair growth						
time of tooth eruption				n		
time of ear opening						
time of eye opening				x		
Functional development: motor activity				n		
Functional development: reflex ontogeny						
Functional development: sensory function						
Functional development: learning and memory						
age at testes descend					x	x
age and/or body weight at balanio-preputial separation	x	n		x		
age and/or body weight at vaginal opening	x	x	x	x		
onset of oestrus behaviour (menses)						
postnatal structural and functional development	n	x	x	x		
offspring reproduction						
reproductive organs						
weight uterus	n	x	x	n		n
weight vagina		x	x			
histopathology uterus + vagina		x	x			
uterine hyperplasia		x	x			
changes in uterine pathology and cellular growth		x	x			
changes in uterine protein expression						
labeling index for uterine luminal and glandular epithelium						
weight ovaries	n	x		x		n
histopathology ovaries						
quantitative analysis of primordial follicles		n		x		
histopathology oviduct						
histopathology vagina		x	x			
histopathology mammary gland (male/female)		x	x	x	x	x
weight testes	n	n		x	n	x
histopathology testes				x		x
weight epididymides	n	n		x	n	x
histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)				x		x
number of spermatis	n	n		n		x
sperm morphology	n	n		n		
sperm motility	n	n		n		
sperm reserve	n	n		x	x	x
weight total prostate	n	n		x	x	x
weight ventral prostate	n	n		x	x	x
histopathology prostate				x		
weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCG)	n	n		x	x	x
histopathology seminal vesicle				x	x	x
histopathology coagulating gland						
weight glans penis		x			x	
weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle		n			x	x
weight paired Cowper's glands (COW)					x	x
Sexual behaviour						
mounts				n		
intromissions				x		
ejaculations				x		
lordosis						
vaginal plugs/sperm				x		
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)						
weight adrenals	x	n		x		n
histopathology adrenals						
weight pituitary	n	n		x		
histopathology pituitary						
weight thyroid				n		
histopathology thyroid						
serum hormone level LH	n			n		x
serum hormone level FSH	n			n		x
serum hormone level TSH	n			n		
serum hormone level prolactin	x			n		
serum hormone level estradiol	x	x		x		
serum hormone level progesterone	x			x		
serum hormone level testosterone	n			x		x
serum hormone level DHT	n			x		
serum hormone level T4	n			x		
serum hormone level T3	n			x		
additional data						
	additionally hepatic histological changes, signs of neurotoxicity, increased female mortality, skin changes, no effect on retention of nipples/areolae in males,	additionally absence of nipples/areolae in females, agenesis of female reproductive tissues/organs and formation of male-type tissues as prostate in females, increased female mortality due to reproductive tract malformations	additionally absence of nipples/areolae in females, agenesis of female reproductive tissues/organs and formation of male-type tissues as prostate in females	additionally changed hepatic enzyme activity, increased incidence of male reproductive organ malformations, retention of nipples/areolae in male pups, increased incidence of renal bladder stones, increased male adult mortality, no effect on pinna unfolding in pups,	additionally increased incidence of hydroureter, retention of nipples/areolae in males, increased incidence of epididymal granulomas,	additionally retention of nipples in males, multiple malformations of the male reproductive tract, inflammatory changes in testes, epididymis and seminal vesicles, feminization of male pups

Fortsetzung Tabelle 34

x = adversely influenced n = examined with no effect	endocrine disrupting compounds with known mechanism				
References	Bowman, C.J. et al. (2003): Toxicological Sciences 74: 393-406	McIntyre, B.S., Barlow, N.J. & P.M.D. Foster (2002): Toxicological Sciences 65: 62-70; McIntyre, B.S. et al. (2000): Toxicology and Applied Pharmacology 167: 87-99	Bakke, J.L. et al. (1977): Biology of the Neonate 31:71-83; Rosato, R.R., Gimenez, M.S. & G.A. Jahn (1992): Acta Endocrinologica 127: 547-554	Hapon, M.B. et al. (2003): Reproduction 126:371-382	York, R.G. et al. (2001): International Journal of Toxicology 20:183-197; York, R.G. et al. (2004): International Journal of Toxicology 23:191-214
Number of studies	1	2	2	1	2
CAS number	98319-26-7	330-55-2	51-48-9	51-52-5	7790-98-9
Compound	Finasteride	Linuron	Thyroxine	Propylthiouracil	Ammonium perchlorate
Acting mechanism	antiandrogen, 5 alpha reductase inhibitor	weak antiandrogen, AR antagonist, aromatase inhibitor	physiological thyroid hormone (T4)	thyreostatic, blockage of peroxidase	thyreostatic, inhibition of iodide transport
Affected parameter					
general toxicity parameter					
body weight/body weight changes	x	x	x	x	n
weight brain					x
weight heart					n
weight kidney	n	x			n
weight liver	n	n			x
weight spleen					n
weight thymus					n
mating, fertility, gestation, parturition, lactation					
ovulation rate		n			n
oestrus cycle length and normality			x		n
mating index					n
time-to-mating/number of days until mating, precoital interval					n
fertility/fertility index				n	n
number/percentage of fertile males				n	n
number/percentage of pregnant females				n	n
gestation/gestation index		n	n	n	n
number of corpora lutea					n
number of implantations					n
preimplantation loss					x
resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	n	n	n	x	x
gestation length	n			x	n
weight gain during gestation	x	x		x	n
signs of prolonged or difficult parturition			x		n
litter size	n	n	x	x	n
number of stillbirths	n	n			x
number of live births/live fetuses	n				x
viability index			x		n
lactation index			x		n
milk quantity and quality			x	x	
sex/sex ratio of pups	n	n			
development of offspring					
number of pups with grossly visible abnormalities	x	x			
external/internal malformations and variations	x	x			
survival of pups	n	x	x	x	n
body weight of pups at day 0 or 1	n	n	x	x	n
weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	n	x	x	x	n
anogenital distance at day 0 or 1	x	x	x	x	n
time of hair growth					
time of tooth eruption					
time of ear opening					
time of eye opening			x		x
Functional development: motor activity					n
Functional development: reflex ontogeny					n
Functional development: sensory function					n
Functional development: learning and memory					n
age at testes descend	x	x			
age and/or body weight at balanopreputial separation	x	x			n
age and/or body weight at vaginal opening		n	x		x
onset of oestrus behaviour (meneses)		n	x		
postnatal structural and functional development					
offspring reproduction					
reproductive organs					
weight uterus	n	n	n		
weight vagina					
histopathology uterus + vagina					
uterine hyperplasia					
changes in uterine pathology and cellular growth					
changes in uterine protein expression					
labeling index for uterine luminal and glandular epithelium					
weight ovaries					n
histopathology ovaries		n	x		
quantitative analysis of primordial follicles					
histopathology oviduct					
histopathology vagina					
histopathology mammary gland (male/female)	x	x	x	x	
weight testes	x	x	x		n
histopathology testes	x	x			
weight epididymides	x	x			n
histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)	x	x			
number of spermatis		x			n
sperm morphology					n
sperm motility					n
sperm reserve		x			n
weight total prostate	x	x	x		n
weight ventral prostate	x	x			
histopathology prostate	x				
weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCG)	x	n			n
histopathology seminal vesicle	x				
histopathology coagulating gland					
weight glans penis					
weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle	x				
weight paired Cowper's glands (COW)					
Sexual behaviour					
mounts					
intromissions					
ejaculations					
lordosis					
vaginal plugs/sperm					
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)					
weight adrenals	n	n	x		n
histopathology adrenals					n
weight pituitary					
histopathology pituitary					
weight thyroid			x		x
histopathology thyroid					x
serum hormone level LH		n			
serum hormone level FSH					
serum hormone level TSH			x	x	x
serum hormone level prolactin			x	x	
serum hormone level estradiol			x	x	
serum hormone level progesterone					
serum hormone level testosterone		n	x	x	
serum hormone level DHT					
serum hormone level T4			x	x	x
serum hormone level T3			x	x	x
additional data					
additionally retention of nipples/areolae in males, increased incidence of male reproductive organ malformations		additionally retention of nipples/areolae in males, increased incidence of male reproductive organ malformations	additionally increased hypothalamic TRH release, lack of maternal behaviour causing infant death, changes in mammary gland clinical chemistry, prolonged parturition, hypoxia in newborns	additionally changes in oxytocin, insulin-like growth factor, Growth hormones and corticosterone serum concentration, changes in mammary gland hormonal regulation, decreased ability/efficacy of suckling in pups, severe growth retardation pre/postnatally	additionally weight changes of cerebellum, corpus callosum, hippocampus,

Fortsetzung Tabelle 34

x = adversely influenced n = examined with no effect	suspected endocrine disrupting compounds with uncertain acting mechanism				
References	Becci, P. et al. (1982): Journal of Applied Toxicology 2(4): 201-206	Omura, M. et al. (2001): Toxicological Sciences 64: 224-232; Ogata, R. et al. (2001): Journal of Toxicology and Environmental Health 63: 127-144	Nagao, T. et al. (2000): Reproductive Toxicology 14: 513-532; Ty, R.W. et al. (2004): Reproductive Toxicology 18: 241-264; Aso, S. et al. (2005): Journal of Toxicological Sciences 30: S39-S58	Andrade, A.J.M. et al. (2006): Toxicology 225: 64-74; Grande, S.W. et al. (2006): Toxicological Sciences 91(1): 247-254	Matsaura, I. et al. (2005): Journal of Toxicological Sciences 30: S135-S161
Number of studies	1	2	3	2	1
CAS number	17924-92-4	1461-22-9	85-68-7	117-81-7	58-89-9
Compound	Zearalenone	Tributyltin chloride	Butyl benzyl phthalate	Di-(2-ethylhexyl) phthalate	Lindane
Acting mechanism		anti-androgen, possible aromatase inhibitor			
Affected parameter					
general toxicity parameter					
body weight/body weight changes	x	x	x	n	x
weight brain				n	x
weight heart			x		
weight kidney			x	x	x
weight liver			x	x	x
weight spleen			x	n	x
weight thymus			x	n	x
mating, fertility, gestation, parturition, lactation					
ovulation rate					
oestrus cycle length and normality		x	n		x
mating index		n			n
time-to-mating/number of days until mating, pre-coital interval					
fertility/fertility index	x	n			n
number/percentage of fertile males			x		n
number/percentage of pregnant females			x		n
gestation/gestation index	x		n		
number of corpora lutea	x				
number of implantations	x		x	n	x
preimplantation loss					
resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	x		n	n	
gestation length		n			
weight gain during gestation		x	x	n	x
signs of prolonged or difficult parturition		x			
litter size	x	x	x	n	
number of stillbirths					
number of live births/alive fetuses	x	x	x	n	n
viability index	n		n	n	
lactation index	n		n	n	
milk quantity and quality					
sex/sex ratio of pups		n	n	n	
development of offspring					
number of pups with grossly visible abnormalities	x	n	x	x	
external/internal malformations and variations	x		x		x
survival of pups				n	x
body weight of pups at day 0 or 1	n	x	x	x	x
weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	n	x	x	x	x
anocentral distance at day 0 or 1		x	x	x	x
time of hair growth					
time of tooth eruption			x		n
time of ear opening					
time of eye opening		x	x		n
Functional development: motor activity					
Functional development: reflex ontogeny			n		n
Functional development: sensory function					
Functional development: learning and memory					
age at testes descend		n	x	n	
age and/or body weight at balanopreputal separation			x	x	x
age and/or body weight at vaginal opening		x	x	x	x
onset of oestrus behaviour (menses)				x	
postnatal structural and functional development					
offspring reproduction			x		
reproductive organs					
weight uterus		x	x		x
weight vagina					
histopathology uterus + vagina			x		n
uterine hyperplasia					
changes in uterine pathology and cellular growth			x		
changes in uterine protein expression					
labeling index for uterine luminal and glandular epithelium					
weight ovaries		x	x	n	x
histopathology ovaries		n	x		n
quantitative analysis of primordial follicles		n			n
histopathology oviduct					
histopathology vagina					
histopathology mammary gland (male/female)			x		
weight testes		x	x	x	x
histopathology testes		x	x	x	n
weight epididymides		x	x	n	x
histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)					
number of spermatis		x	x	n	n
sperm morphology		x			n
sperm motility					n
sperm reserve					n
weight total prostate		x	x	x	n
weight ventral prostate					
histopathology prostate			x		n
weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVC/G)		n	x		n
histopathology seminal vesicle			x		n
histopathology coagulating gland					
weight glans penis					
weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle					
weight paired Cowper's glands (COW)					
Sexual behaviour					
mounts					
intromissions					
ejaculations					
lordosis					
vaginal plugs/sperm					
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)					
weight adrenalis	x		x		x
histopathology adrenals					n
weight pituitary	x		x		x
histopathology pituitary					
weight thyroid	x		x	n	
histopathology thyroid					x
serum hormone level LH		x	x		n
serum hormone level FSH			x		n
serum hormone level TSH			x		n
serum hormone level prolactin			x		n
serum hormone level estradiol		x	x		n
serum hormone level progesterone			n		n
serum hormone level testosterone		x	x	n	n
serum hormone level DHT					n
serum hormone level T4			x		x
serum hormone level T3			x		x
additional data					
additionally changes in bone structure, changes of hepatic enzymes		additionally delayed testicular spermatation, vacuolization of testicular epithelium,	additionally increased incidence of gross hepatic changes, increased pancreas weight, increased lung weight, thymus atrophy, retention of nipples/areolae in male pups, massive degenerative changes in reproductive tract malformations, delayed pinna unfolding in pups	additionally female sexual maturation delayed without decreased body weight, increased retention of nipples/areolae in male pups, massive degenerative changes in testicular tissues	additionally increased adult mortality, signs of neurotoxicity, changed hepatic enzyme activity, hepatic and renal hypertrophy, delayed pinna unfolding in pups, lack of nursing behaviour in dams

Fortsetzung Tabelle 34

x = adversely influenced n = examined with no effect		suspected endocrine disrupting compounds with uncertain acting mechanism				
References	Number of studies	1	2	1	2	2
CAS number	Compound	87-86-5	80-05-7	119-61-9	120-83-2	84852-15-3
Acting mechanism	Compound	Pentachlorophenol	Bisphenol A	Benzophenone	2,4-Dichlorophenol	4-Nonylphenol
Affected parameter	general toxicity parameter		weak ER agonist			
	body weight/body weight changes	x	x	x	x	x
	weight brain	x	x	x	x	x
	weight heart	x	x	x	x	x
	weight kidney	x	x	x	x	x
	weight liver	x	x	x	x	x
	weight spleen	x	x	x	x	x
	weight thymus	x	x	x	x	x
	mating, fertility, gestation, parturition, lactation					
	ovulation rate					x
	oestrus cycle length and normality	x	n	n	n	x
	mating index		n	n	n	n
	time-to-mating/number of days until mating, precoital interval		n	n	n	n
	fertility/fertility index	n	n	n	n	n
	number/percentage of fertile males	x	n	n	n	n
	number/percentage of pregnant females		n	n	n	n
	gestation/gestation index		n	n	n	n
	number of corpora lutea		n	n	n	n
	number of implantations	x	x	n	x	n
	preimplantation loss		x	n	x	n
	resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	x	n	n	x	n
	gestation length	x	x	n	x	x
	weight gain during gestation	x	n	x	x	x
	signs of prolonged or difficult parturition		n	n	n	n
	litter size	x	x	n	x	x
	number of stillbirths		n	n	x	n
	number of live births/live fetuses		n	n	n	x
	viability index	x	n	n	n	n
	lactation index	x	n	n	n	n
	milk quantity and quality		n	n	n	n
	sex/sex ratio of pups		n	n	n	n
	development of offspring					
	number of pups with grossly visible abnormalities		n	n	n	n
	external/internal malformations and variations	x	n	n	n	n
	survival of pups	x	n	n	n	n
	body weight of pups at day 0 or 1	x	x	x	x	x
	weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	x	x	x	x	x
	anogenital distance at day 0 or 1	x	x	x	n	n
	time of hair growth		n	n	x	n
	time of tooth eruption		n	n	x	n
	time of ear opening		n	n	x	n
	time of eye opening		n	n	x	n
	Functional development: motor activity		x	n	n	n
	Functional development: reflex ontogeny		x	n	n	n
	Functional development: sensory function			n	n	n
	Functional development: learning and memory			n	n	n
	age at testes descent		x	n	x	x
	age and/or body weight at balanopreputal separation	x	x	n	x	x
	age and/or body weight at vaginal opening	x	x	n	x	x
	onset of oestrus behaviour (meneses)		n	n	n	n
	postnatal structural and functional development		x	n	x	n
	offspring reproduction		x	n	x	n
	reproductive organs					
	weight uterus	x	x	n	x	x
	weight vagina		n	n	n	n
	histopathology uterus + vagina		n	n	n	n
	uterine hyperplasia		n	n	n	n
	changes in uterine pathology and cellular growth		n	n	n	n
	changes in uterine protein expression		n	n	n	n
	labelling index for uterine luminal and glandular epithelium		n	n	n	n
	weight ovaries	x	x	x	x	x
	histopathology ovaries	x	x	n	n	n
	quantitative analysis of primordial follicles	x	x	n	n	n
	histopathology oviduct		n	n	n	n
	histopathology vagina		n	n	n	n
	histopathology mammary gland (male/female)		n	n	x	n
	weight testes	x	x	x	x	x
	histopathology testes	x	n	n	n	n
	weight epididymides	x	x	n	n	n
	histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)	x	n	n	n	n
	number of spermatic	x	n	n	n	x
	sperm morphology	n	n	n	n	n
	sperm motility	n	n	n	n	n
	sperm reserve	n	x	n	n	x
	weight total prostate	x	x	n	n	x
	weight ventral prostate	x	n	n	n	n
	histopathology prostate	x	n	n	n	n
	weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCG)	x	x	n	n	n
	histopathology seminal vesicle		n	n	n	n
	histopathology coagulating gland		n	n	n	n
	weight glans penis		n	n	n	n
	weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle		n	n	n	n
	weight paired Cowper's glands (COW)		n	n	n	n
	Sexual behaviour					
	mounts		n	n	n	n
	intromissions		n	n	n	n
	ejaculations		n	n	n	n
	lordosis		n	n	n	n
	vaginal plugs/sperm		n	n	n	n
	endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)					
	weight adrenals		x	n	x	n
	histopathology adrenals		n	n	n	n
	weight pituitary		x	x	x	n
	histopathology pituitary		n	n	n	n
	weight thyroid		x	n	n	n
	histopathology thyroid		n	n	n	n
	serum hormone level LH		x	n	n	n
	serum hormone level FSH		n	n	n	n
	serum hormone level TSH		n	n	n	n
	serum hormone level prolactin		n	n	n	n
	serum hormone level estradiol		n	x	n	n
	serum hormone level progesterone		n	n	n	n
	serum hormone level testosterone		n	x	n	n
	serum hormone level DHT		n	n	n	n
	serum hormone level T4		n	n	n	n
	serum hormone level T3		n	n	n	n
	additional data	additionally increased salivation, ungrooved appearance, hepatic inflammation and necrosis	additionally chronic hepatic inflammation, renal degeneration, increased primordial follicle count, decreased weight of preputial gland, decreased pup and adult lung weight, no changes at delivery index and pinna unfolding	additionally preterm pinna unfolding, hepatic hypertrophy, histopathological renal changes are not significant	additionally renal dilatation, changes in immune system response	additionally chronic renal inflammation, formation of renal cysts, degeneration of testicular seminiferous tubules, preterm female and delayed male sexual maturation

Fortsetzung Tabelle 34

x = adversely influenced n = examined with no effect	suspected endocrine disrupting compounds with uncertain acting mechanism				
References	Dodd, D.E. et al. (1987): Fundamental and Applied Toxicology 8: 493-505	Faber, W.D. et al. (2006): Birth Defects Research 77: 10-21	Christian, M.S. et al. (2002): International Journal of Toxicology 21: 237-276	Yamada, T. et al. (2003): Toxicological Sciences 71: 95-103; Furuhashi, K. et al. (2006): Toxicology 224: 219- 228	Takeuchi, T. et al. (2004): Reproductive Toxicology 18: 431-437; Kang, K.S. et al. (2002): Reproductive Toxicology 16: 151-159; Kim, J.-C. et al. (2004): Toxicology 196: 77-86
Number of studies	1	1	1	2	3
CAS number	98-95-3	100-41-4	631-64-1	106-94-5	75-26-3
Compound	Nitrobenzene	Ethylbenzene	Dibromoacetic acid	1-Bromopropane	2-Bromopropane
Acting mechanism					
Affected parameter	general toxicity parameter				
body weight/body weight changes	x	x	x	x	x
weight brain					
weight heart					
weight kidney		x	x	x	
weight liver		x	x	x	
weight spleen			x	n	
weight thymus		n	x	n	
mating, fertility, gestation, parturition, lactation					
ovulation rate				x	
oestrus cycle length and normality		x	n	x	
mating index		n	n		
time-to-mating/number of days until mating, pre-coital interval		n	n		n
fertility/fertility index	x				x
number/percentage of fertile males	x				x
number/percentage of pregnant females	x				x
gestation/gestation index			n		x
number of corpora lutea					n
number of implantations	x	n	n		n
preimplantation loss					
resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	x			x	x
gestation length	n		x		
weight gain during gestation	x	x	x		x
signs of prolonged or difficult parturition				x	
litter size	x	n	n	n	x
number of stillbirths				x	x
number of live births/live fetuses	n		n	n	
viability index			x		
lactation index	n		n		
milk quantity and quality				n	
sex/sex ratio of pups	x	n	n	n	x
development of offspring					
number of pups with grossly visible abnormalities					x
external/internal malformations and variations					x
survival of pups	n	n	x	x	x
body weight of pups at day 0 or 1	x	n	n	n	x
weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	x	n	x	n	x
anogenital distance at day 0 or 1				n	x
time of hair growth					
time of tooth eruption		n			
time of ear opening					
time of eye opening		n			
Functional development: motor activity					
Functional development: reflex ontogeny					
Functional development: sensory function					
Functional development: learning and memory					
age at testes descend					
age and/or body weight at balano-preputial separation			x		x
age and/or body weight at vaginal opening		x	x		
onset of oestrus behaviour (menses)					
postnatal structural and functional development					
offspring reproduction			n		x
reproductive organs					
weight uterus			n	n	x
weight vagina			n	n	x
histopathology uterus + vagina	n			n	x
uterine hyperplasia					
changes in uterine pathology and cellular growth					
changes in uterine protein expression					
labeling index for uterine luminal and glandular epithelium					
weight ovaries		n	n	n	n
histopathology ovaries	n	n	n		x
quantitative analysis of primordial follicles				x	x
histopathology oviduct					
histopathology vagina	n				
histopathology mammary gland (male/female)					
weight testes	x		n	n	x
histopathology testes	x		x	x	x
weight epididymides	x		x	n	x
histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)	x		x	x	x
number of spermatis	x	n	x		x
sperm morphology		n	x		
sperm motility		n	x		
sperm reserve	x		x		x
weight total prostate		x	n	x	x
weight ventral prostate					
histopathology prostate		n		n	x
weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCG)					
histopathology seminal vesicle			x		
histopathology coagulating gland					
weight glans penis					
weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle					
weight paired Cowper's glands (COW)					
Sexual behaviour					
mounds					
intromissions					
ejaculations					
lordosis					
vaginal plugs/sperm					
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)					
weight adrenals			x	x	
histopathology adrenals			x		
weight pituitary			x		
histopathology pituitary					
weight thyroid		x			
histopathology thyroid		n			
serum hormone level LH				n	
serum hormone level FSH				n	
serum hormone level TSH					
serum hormone level prolactin					
serum hormone level estradiol					
serum hormone level progesterone					
serum hormone level testosterone					
serum hormone level DHT					
serum hormone level T4					
serum hormone level T3					
additional data					
	additionally decreased number of male pups, atrophic or degenerated testes, no improvement after recovery	additionally no effect on pinna unfolding, but preterm female and delayed male sexual maturation without changes in body weight	additionally increased parental mortality, decreased food and water consumption, increased incidence and intensity of splenic extramedullary hematopoiesis,	additionally total loss of ovarian cyclicity, lack of maternal behaviour, increased maternal mortality, changes in hepatic enzyme activity, renal tubule dilatation	additionally weakness, dull fur, decreased food consumption, increased lacrimation, massive increase of intra-uterine death

Fortsetzung Tabelle 34

x = adversely influenced n = examined with no effect	compounds with known reproduction toxicity without endocrine properties				
References	Trasler, J.M., Hales, B.F. & B. Robaire (1990): Biology of Reproduction 34: 275-283; Trasler, J.M., Hales, B.F. & B. Robaire (1987): Biology of Reproduction 37: 317-326	Pollard, I. & R. Classens (1992): Reproductive Toxicology 6: 541-545; Pollard, I. & J. Smallshaw (1998): Journal of Developmental Physiology 10: 271-281	Beilles, R.P. et al. (1985): Fundamental and Applied Toxicology 5: 855-868; Cruzan, G. et al. (2005): Birth Defects Research 74: 211-220	Dalgaard, M. et al. (2001): Archives of Toxicology 75:103-109; Roberts, L.G., Bevens, A.C. & C.A. Schreiner (2003): Reproductive Toxicology 17: 649-656; Roberts, L.G., Nicolich, M.J. & C.A. Schreiner (2007): Reproductive Toxicology 23: 521-531	Hellwig, J., Gembardt, C. & S. Jashi (2002): Food and Chemical Toxicology 40: 1515-1523
Number of studies	2	2	2	3	1
CAS number	50-18-0	58-08-2	100-42-5	108-88-3	109-99-9
Compound	Cyclophosphamide	Caffeine	Styrene	Toluene	Tetrahydrofuran
Acting mechanism	cytostatic				
Affected parameter					
general toxicity parameter					
body weight/body weight changes	x	n	x	x	x
weight brain			x	n	
weight heart				n	
weight kidney			n	n	x
weight liver			x	n	n
weight spleen	x				
weight thymus			x		
mating, fertility, gestation, parturition, lactation					
ovulation rate		x			
oestrus cycle length and normality		x	x		
mating index	n	n	n		n
time-to-mating/number of days until mating, pre-coital interval		n	n		n
fertility/fertility index		n	n	n	n
number/percentage of fertile males		n	n		
number/percentage of pregnant females	n	n	n		n
gestation/gestation index	n	n	n	n	n
number of corpora lutea		n	n		
number of implantations	x		n	n	n
preimplantation loss		n	n		
resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	x		x	n	n
gestation length		n	n	n	x
weight gain during gestation		n	n		
signs of prolonged or difficult parturition		x	x	x	x
litter size	x	n	n		n
number of stillbirths		x	n		
number of live births/live fetuses	x	x	x	n	n
visibility index				n	n
lactation index				n	n
milk quantity and quality		n	n	n	n
sex/sex ratio of pups		n	n	n	n
development of offspring					
number of pups with grossly visible abnormalities		x		x	
external/internal malformations and variations	x	x	x	x	x
survival of pups		x	x	n	x
body weight of pups at day 0 or 1	x (fetuses)	x	x	x (fetuses)	n
weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)		x	x	x	x
anogenital distance at day 0 or 1					
time of hair growth					
time of tooth eruption			n		
time of ear opening			n		x
Functional development: motor activity					
Functional development: reflex ontogeny					
Functional development: sensory function					
Functional development: learning and memory					
age at testes descend					
age and/or body weight at balanopreputial separation			n		
age and/or body weight at vaginal opening			n		
onset of oestrus behaviour (menses)					
postnatal structural and functional development			x		
offspring reproduction					
reproductive organs					
weight uterus			x	n	
weight vagina				n	
histopathology uterus + vagina			n	n	n
uterine hyperplasia					
changes in uterine pathology and cellular growth					
changes in uterine protein expression					
labeling index for uterine luminal and glandular epithelium					
weight ovaries			n		
histopathology ovaries			n	n	n
quantitative analysis of primordial follicles					
histopathology oviduct					
histopathology vagina					
histopathology mammary gland (male/female)				n	
weight testes	x		n	n	n
histopathology testes		x	n	n	n
weight epididymides	x				
histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)				n	n
number of spermatis	x	x			
sperm morphology			n	n	
sperm motility			n	n	
sperm reserve	x			n	
weight total prostate	x				
weight ventral prostate				n	n
histopathology prostate					
weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCG)	x			n	n
histopathology seminal vesicle					
histopathology coagulating gland				n	n
weight glans penis					
weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle					
weight paired Cowper's glands (COW)					
Sexual behaviour					
mounts					
intromissions					
ejaculations					
lordosis					
vaginal plugs/sperm					
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)					
weight adrenals			n		
histopathology adrenals				n	
weight pituitary	x		x		
histopathology pituitary			x		n
weight thyroid			n		
histopathology thyroid			n	n	
serum hormone level LH	n			n	
serum hormone level FSH	n				
serum hormone level TSH					
serum hormone level prolactin					
serum hormone level estradiol					
serum hormone level progesterone					
serum hormone level testosterone					
serum hormone level DHT	n				
serum hormone level T4					
serum hormone level T3					
additional data					
	additionally increased adult mortality, intestinal bleeding, reduced hematocrit and leukocyte count	additionally increased incidence of heavy bleeding during parturition, increased maternal peripart mortality, degeneration of testes, atrophy of seminiferous tubules, increased number of runts, no effect on corticosterone levels	additionally degeneration of nasal cavity due to inhalative exposure	additionally neurologic symptoms, increased incidence of cerebral apoptotic cell death in juveniles, reduced food consumption, increased incidence of mikrophthalmia, ankyloglossia, reduced or unossified sternbraes (none at reproductive organs)	additionally decreased food consumption, derased water intake due to treatment via drinking water

Fortsetzung Tabelle 34

x = adversely influenced n = examined with no effect	compounds with known reproduction toxicity without endocrine properties				
References Number of studies	1 2-generation study	3 Frenatal developmental toxicity and 1-generation studies	1 2-generation study	1 2-generation study	2 Prenatal developmental toxicity and 2-generation study
CAS number	111-30-8	67-66-3	107-02-8	79-10-7	1717-00-6
Compound	Glutaraldehyde	Chloroform	Acrolein	Acrylic acid	1,1-Dichloro-1-fluoroethane
Acting mechanism		anesthetic			
Affected parameter					
general toxicity parameter					
body weight/body weight changes	x	x	x	x	x
weight brain					
weight heart					
weight kidney				n	
weight liver		x		n	
weight spleen					
weight thymus					
mating, fertility, gestation, parturition, lactation					
ovulation rate					
oestrus cycle length and normality					
mating index	n			n	
time-to-mating/number of days until mating, pre-coital interval					
fertility/fertility index	n		n	n	x
number/percentage of fertile males	n				
number/percentage of pregnant females	n				
gestation/gestation index	n	x	n	n	x
number of corpora lutea	n				
number of implantations	n		n	n	n
preimplantation loss	n				
resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	n	x	n	n	x
gestation length					
weight gain during gestation	x	x		x	x
signs of prolonged or difficult parturition					
litter size	n		n	n	x
number of stillbirths	n		n	n	
number of live births/live fetuses	n	x	n	n	x
viability index	n				
lactation index			n		
milk quantity and quality					
sex/sex ratio of pups		n	n	n	n
development of offspring					
number of pups with grossly visible abnormalities		x			n
external/internal malformations and variations		x			n
survival of pups	n		x	n	n
body weight of pups at day 0 or 1		x (fetuses)			x (fetuses)
weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	x	x	x	x	x
anogenital distance at day 0 or 1					
time of hair growth					
time of tooth eruption				x	
time of ear opening				x	
time of eye opening					
Functional development: motor activity				n	
Functional development: reflex ontogeny					
Functional development: sensory function					
Functional development: learning and memory					
age at testes descend					
age and/or body weight at balanopreputial separation					x
age and/or body weight at vaginal opening					n
onset of oestrus behaviour (menses)					
postnatal structural and functional development					
offspring reproduction	n			n	
reproductive organs					
weight uterus					n
weight vagina					n
histopathology uterus + vagina	n		n	n	n
uterine hyperplasia					
changes in uterine pathology and cellular growth					
changes in uterine protein expression					
labeling index for uterine luminal and glandular epithelium					
weight ovaries	n		n	n	n
histopathology ovaries	n		n	n	n
quantitative analysis of primordial follicles					
histopathology oviduct					
histopathology vagina					
histopathology mammary gland (male/female)					
weight testes	n		n	n	n
histopathology testes	n		n	n	n
weight epididymides	n		n	n	n
histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)	n		n	n	n
number of spermatis					
sperm morphology					
sperm motility					
sperm reserve					
weight total prostate	n				x
weight ventral prostate					
histopathology prostate	n				n
weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCG)	n				x
histopathology seminal vesicle	n			n	n
histopathology coagulating gland					
weight glans penis					
weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle					
weight paired Cowper's glands (COW)					
Sexual behaviour					
mounds					
intromissions					
ejaculations					
lordosis					
vaginal plugs/sperm					
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)					
weight adrenals			n		
histopathology adrenals			n		
weight pituitary			n		
histopathology pituitary			n		n
weight thyroid			n		
histopathology thyroid			n		
serum hormone level LH					
serum hormone level FSH					
serum hormone level TSH					
serum hormone level prolactin					
serum hormone level estradiol					
serum hormone level progesterone					
serum hormone level testosterone					
serum hormone level DHT					
serum hormone level T4					
serum hormone level T3					
additional data	additionally reduced food and water intake	additionally severe anorexia in maternal animals, reduced serum insulin and glucose concentrations, fatty degeneration of the liver, alopecia	additionally increased maternal and paternal mortality, respiratory distress, intestinal ulceration/inflammation,	additionally adult foetostomach lesions due to oral exposure; no effect on pinna unfolding in pups	additionally transient lethargia and reduced reflex response, growth retardation of fetuses

Fortsetzung Tabelle 34

x = adversely influenced n = examined with no effect	compounds with known reproduction toxicity without endocrine properties				
References Number of studies	Biles, R.W. (1987): Toxicology and Industrial Health 3(4): 519-534; Bevan, C. et al. (1997): Journal of Applied Toxicology 17(S1): S13-S19	Bevan, C. et al. (1995): Journal of Applied Toxicology 15(2): 117-123	Dorman, D.C. et al. (2000): Neurotoxicology and Teratology 22:71-84	Khan, A.T. et al. (2007): Journal of Environmental Science and Health Part B 42: 403-415	Zenick, H. et al. (1984): Toxicology and Applied Pharmacology 73: 275-283; Sallierfait, A.M., Bonnet, P. & J. de Ceaurriz (1989): Toxicology Letters 48: 57-66
CAS number	1634-04-4	67-63-0	7783-06-4	7646-85-7	75-15-0
Compound	Methyl tertiary butyl ether	Isopropanol	Hydrogen sulfide	Zinc chloride	Carbon disulfide
Acting mechanism					
Affected parameter					
general toxicity parameter					
body weight/body weight changes	x	x	n	x	x
weight brain			n	x	
weight heart			n	x	
weight kidney		x	n	x	
weight liver		x	n	x	
weight spleen	x	x	n	x	
weight thymus			n	n	
mating, fertility, gestation, parturition, lactation					
ovulation rate					
oestrus cycle length and normality					
mating index	n	x	n		
time-to-mating/number of days until mating, pre-coital interval					
fertility/fertility index	n	n	n	x	
number/percentage of fertile males	n				
number/percentage of pregnant females	n				
gestation/gestation index		n			
number of corpora lutea					
number of implantations			n		n
preimplantation loss					
resorption (post-implantation loss), mortality (embryo/fetal), abortions	n			x	n
gestation length			n		
weight gain during gestation	x	x		x	x
signs of prolonged or difficult parturition					
litter size	n	n	n	x	n
number of stillbirths	n	x	n		
number of live births/live fetuses	n	x	n	x	
viability index	n	n			
lactation index					
milk quantity and quality					
sex/sex ratio of pups	n			n	n
development of offspring					
number of pups with grossly visible abnormalities			n		x
external/internal malformations and variations					
survival of pups	x	x	n	x	x
body weight of pups at day 0 or 1		x	n	n	x (refuses)
weight/weight gain of pups during lactation (days 0-21)	x	x	n	x	
anogenital distance at day 0 or 1					
time of hair growth					
time of tooth eruption			n		
time of ear opening			n		
time of eye opening			n		
Functional development: motor activity			n		
Functional development: reflex ontogeny			n		
Functional development: sensory function			n		
Functional development: learning and memory			n		
age at testes descent			n		
age and/or body weight at balanopreputal separation			n		
age and/or body weight at vaginal opening			n		
onset of oestrus behaviour (menses)			n		
postnatal structural and functional development					
offspring reproduction	n	x	n		
reproductive organs					
weight uterus	n			x	
weight vagina					
histopathology uterus + vagina	n	n	x		x
uterine hyperplasia			x		
changes in uterine pathology and cellular growth			x		
changes in uterine protein expression					
labeling index for uterine luminal and glandular epithelium					
weight ovaries	n		x	n	
histopathology ovaries	n	n	x		
quantitative analysis of primordial follicles					
histopathology oviduct					
histopathology vagina					
histopathology mammary gland (male/female)					
weight testes	n			x	n
histopathology testes	n	n	x		n
weight epididymides	n			n	n
histopathology epididymides (caput, corpus, cauda)	n	n	x		n
number of spermids			n		x
sperm morphology			x		
sperm motility			n		
sperm reserve			n		
weight total prostate	n			n	x
weight ventral prostate					
histopathology prostate	n	n		x	
weight seminal vesicle (incl. fluids and coagulating glands, SVCS)	n	n	n	x	n
histopathology seminal vesicle	n				
histopathology coagulating gland					
weight glans penis					
weight levator ani-bulbocavernosus (LABC) muscle					
weight paired Cowper's glands (COW)					
Sexual behaviour					
mounts					x
intromissions					
ejaculations					x
lordosis					
vaginal plugs/sperm					
endocrine glands and hormone concentrations (excl. gonads)					
weight adrenals			x	x	
histopathology adrenals					
weight pituitary	n			n	
histopathology pituitary	n	n			
weight thyroid					
histopathology thyroid					
serum hormone level LH					n
serum hormone level FSH					n
serum hormone level TSH					
serum hormone level prolactin					
serum hormone level estradiol					
serum hormone level progesterone					
serum hormone level testosterone					n
serum hormone level DHT					
serum hormone level T4					
serum hormone level T3					
additional data	additionally signs of neurotoxicity, renal dilatation	additionally increased adult mortality, renal hyperplasia and degeneration, liver hypertrophy	additionally decreased food consumption, sensory neuron loss, no effect on pinna unfolding	additionally increased parental mortality, alopecia, increased aggression and hyperactivity, stomach ulceration/haemorrhage, hemosiderosis and lymphoid depletion of the spleen, chronic prostatic inflammation and atrophy	additionally growth alteration, increased incidence of delayed ossification, malformation of non-reproductive organs (e.g. clubfoot)

Tabelle 35: Effekte einer Exposition von Ratten gegenüber der endokrin wirksamen Substanz Vinclozolin in Abhängigkeit von Expositionsszenario, Lebensphase und Geschlecht^{130,134}. Effekte mit Abhängigkeit zum Expositionszeitraum wurden farbig unterlegt. Abkürzungen: ↑: Zunahme; ↓: Abnahme; Δ: Veränderung

Exposition	Beobachtung	Effekte in Männchen	Effekte in Weibchen
prä- und postnatal	fetal	kein Effekt auf Mortalität	kein Effekt auf Mortalität
	neonatal	Körpergewicht: ↓ Anogenitalabstand: ↓ (Feminisierg.) Fehlbildungen: Prostata, äußere Geschlechtsorgane Feminisierung der Mammae Leber: Enzymaktivität Δ kein Effekt auf Mortalität	Körpergewicht: ↓ Leber: Enzymaktivität Δ kein Effekt auf Mortalität
	pubertär	verzögerte sexuelle Reifung	kein Effekt auf sexuelle Reifung
	adult	Mortalität: ↑ Körpergewicht: ↓ Prostata: Atrophie Nebennieren: Gewicht ↑, Lipidose Hoden: Atrophie/Ektopie, Tumore Nebenhoden: Gewicht ↓, Tumore Hypophyse: Hypertropie Nieren: Gewicht ↑ Samenbläschen: Atrophie Leber: Hypertrophie, Enzymaktivität Δ Hormonkonzentration: Schilddrüsenhormone ↓, Hypophysenhormon FSH + LH ↑ Fertilität: ↓ Spermienproduktion: ↓ Sexualverhalten: Δ	Körpergewicht: ↓ Nebennieren: Gewicht ↑, Lipidose Leber: Hypertrophie, Enzymaktivität Δ Eierstöcke: Hyperplasie Hormonkonzentration: Schilddrüsenhormone ↓ kein Effekt auf Mortalität
adult	adult	Nebennieren: Gewicht ↑, Lipidose Leber: Hypertrophie, Enzymaktivität Δ Hypophyse: Hypertrophie Hoden: Hyperplasie Nebenhoden: Gewicht ↓ Samenbläschen: Atrophie Hormonkonzentration: Schilddrüsenhormone ↓, Hypophysenhormone LH ↓;FSH ↑ keine Effekte auf die Fertilität oder Spermienproduktion	Körpergewicht: ↓ Nebennieren: Gewicht ↑, Lipidose Leber: Hypertrophie, Enzymaktivität Δ Nieren: Gewicht ↑ Hypophyse: Gewicht ↑, Hypertrophie Eierstöcke: Hyperplasie Hormonkonzentration: Schilddrüsenhormone ↓ keine Effekte auf die Fertilität oder den Östruszyklus

Tabelle 36: Vergleich der LOEL (Lowest Observed Effect Level) für die Gesamttoxizität (oLOEL) und Effekte auf die Hoden und Spermienproduktion in Repeated-Dose-Studien und Multigenerationsstudien

Name CAS-Nummer	Repeated Dose Studien	Multigenerations-Studien
Diethyl phthalate 84-66-2	oLOEL = 150 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 3160 mg/kg/d	oLOEL = 150 mg/kg/d LOEL _{Spermien} = 150 mg/kg/d
Dibutyl phthalate 84-74-2	oLOEL = 0,04 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 4,4 mg/kg/d	oLOEL = 0,5 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 0,5 mg/kg/d
Diallyl phthalate 131-17-9	oLOEL = 50 mg/kg/d	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank
Di-isoheptyl phthalate 71888-89-6	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank	oLOEL = 50 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 225 mg/kg/d LOEL _{Spermien} = 50 mg/kg/d
Di-n-octyl phthalate 117-84-0	oLOEL = 1906 mg/kg/d	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank
Bis(2-ethylhexyl)phthalate 117-81-7	oLOEL = 300 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 600 mg/kg/d	oLOEL = 0,045 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 135 mg/kg/d
Di-isononyl phthalate 28553-12-0 68515-48-0	oLOEL = 125 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 500 mg/kg/d oLOEL = 15 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 300 mg/kg/d	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank
Di-isodecyl phthalate 68515-49-1 26761-40-0	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank oLOEL = 25 mg/kg/d	oLOEL = 10 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 40 mg/kg/d keine Daten
Butyl benzyl phthalate 85-68-7	oLOEL = 180 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 1250 mg/kg/d	oLOEL = 100 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 100 mg/kg/d LOEL _{Spermien} = 500 mg/kg/d
Dicyclohexyl phthalate 84-61-7	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank	oLOEL = 12 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 60 mg/kg/d LOEL _{Spermien} = 60 mg/kg/d
Phthalic anhydride 85-44-9	oLOEL = 375 mg/kg/d	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank
Isophthalic acid 121-91-5	oLOEL = 0,162 mg/kg/d	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank
Bis(2-ethylhexyl) terephthalate 6422-86-2	keine Daten in der ausgewerteten Datenbank	oLOEL = 150 mg/kg/d LOEL _{Hoden} = 500 mg/kg/d

Tabelle 37: Beispiele für Struktur-abhängige schädigende Effekte an Hand der Gruppe der Phthalate.

Verglichen wird das Auftreten von Gewichtsveränderungen und histopathologischen Befunden an den Hoden in Repeated-Dose-Studien und entsprechende Effekte, inkl. Beeinträchtigungen der Spermienproduktion, in reproduktionstoxikologischen Multigenerationsstudien

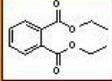
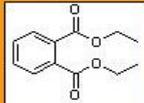
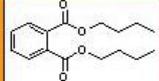
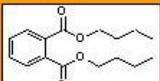
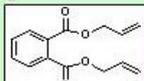
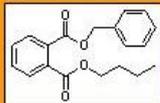
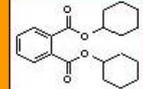
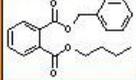
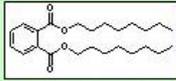
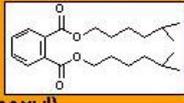
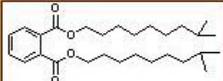
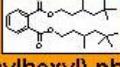
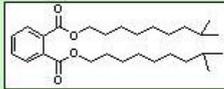
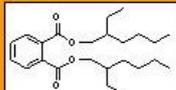
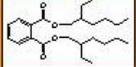
Repeated-Dose Testungen Effekte auf die Hoden		Multi-generations-Studien Effekte auf die Hoden/Spermienproduktion	
adverse Effekte	keine Effekte	adverse Effekte	
Diethyl phthalate 84-66-2 	Phthalic anhydride 85-44-9 	Diethyl phthalate 84-66-2 	Dibutyl phthalate 84-74-2 
Dibutyl phthalate 84-74-2 	Diallyl phthalate 131-17-9 	Butyl benzyl phthalate 85-68-7 	Dicyclohexyl phthalate 84-61-7 
Butyl benzyl phthalate 85-68-7 	Di-n-octyl phthalate 117-84-0 	Di-isoheptyl phthalate 71888-89-6 	Di-isodecyl phthalate 68515-49-1 
Di-isononyl phthalate 28553-12-0/68515-48-0 	Di-isodecyl phthalate 26761-40-0 	Bis(2-ethylhexyl) phthalate 117-81-7 	
Bis-(2-ethylhexyl) phthalate 117-81-7 			

Tabelle 38: Vergleich von *in vivo* Effekten ausgewählter Modellschubstanzen in Säugetier- und Fischtestungen.

Abkürzungen: DMI (Demethylierungsinhibitor, Sterolinhibitor), PLC (partial life cycle), FLC (full life cycle), VTG (Vitellogenin). Die Daten der Fisch-Life Cycle Testungen entstammen dem Forschungsprojekt FKZ 206 67 470: Charakterisierung endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen: Relevante Parameter für die Entwicklung einer neuen OECD Testmethode und die Anwendung in der gesetzlichen Umweltrisikobewertung, Fraunhofer IME im Auftrag des Umweltbundesamtes

Reproductive toxicology database				Fish <i>in vivo</i> effects		
compound	CAS	Mechanism	<i>in vivo</i> EDC effect ?	Full-life cycle Fh-IME, <i>Danio rerio</i>	Literature FLC or PLC	Fish Screening Assay
				Fertilisation rate NOEC	NOEC	
17-alpha Ethinylestradiol	57-63-6	ER agonist		0.3 ng/L, strong	1 ng/L juv. growth gonades	increase VTG
17-beta Estradiol	50-28-2	ER agonist	+		2.9 ng/L fertilisation rate	
Diethylstilbestrol	56-53-1	selective ER agonist and antagonist	+			
Tamoxifen	10540-29-1	selective ER agonist and antagonist	+	1.6 µg/L and VTG reduction in females	1.65 µg/L (PLC) juv. growth 0.11 µg/L (FLC) VTG red.	decrease VTG
Raloxifene	82640-04-8	selective ER agonist and antagonist	+			
Nonylphenol	25154-52-3	ER agonist	+			
Genistein	446-72-0	ER agonist, enzyme inhibitor: aromatase	+	1.3 µg/L, moderate		
p,p'-DDT	50-29-3	ER agonist	+			
Testosterone propionate	57-85-2	AR agonist	+			
Methyl testosterone		AR agonist			9.98 ng/L => males	
17 beta-Trenbolone	10161-33-8	AR agonist	+		1 ng/L sex ratio => males, < 1 ng/L egg debris	no effect on VTG
Vinclozolin (incl. metabolites)	50471-44-8	AR antagonist, possible thyroid modulator	+			
Procymidone	32809-16-8	AR antagonist	+			
Flutamide	13311-84-7	AR antagonist	+	189 µg/L egg production F0		no effect on VTG at 90 ng/L sign effect at 270 ng/L
Finasteride	98319-26-7	enzyme inhibitor: 5-alpha-reductase	+			
Linuron	330-55-2	AR antagonist, enzyme inhibitor: aromatase	+			
Thyroxine	51-48-9	thyroidal hormone, natural agonist	+			
Propylthiouracil	51-52-5	thyreostatic, enzyme inhibitor: peroxidase	+			
Ammonium perchlorate	7790-98-9	thyreostatic, enzyme inhibitor: iodide transport	+			
Butyl benzyl phthalate	85-68-7		+/?			
Lindane	58-89-9		+/?			
Bisphenol A	80-05-7	ER agonist	+/?	86 µg/L, weak	1 µg/L histopathology testis	increase VTG
2,4-Dichlorophenol	120-83-2		+/?			
Benzophenone-3	131-57-7		+/?			
Benzophenone	119-61-9		+/?			
1-Bromopropane	106-94-5		+/?			
2-Bromopropane	75-26-3		+/?			
Di-(2-ethylhexyl) phthalate	117-81-7		+/?			
4-tert-Pentylphenol					<51 µg/L VTG males	
4-tert-Octylphenol	140-66-9			11 µg/L, moderate		increase VTG
4-Nonylphenol	84852-15-3		+/?		4.2 µg/L, gonado-somatic index	
Pentachlorophenol	87-86-5		+/?			
Nitrobenzene	98-95-3		+/?			
Ethylbenzene	100-41-4		+/?			
Dibromoacetic acid	631-64-1		+/?			
Zearalenone	17924-92-4		+/?			
Tributyltin chloride	1461-22-9	anti-androgen, possible enzyme inhibitor: aromatase	+/?			
Prochloraz (DMI fungicide)	67747-09-5	AR Antagonist, enzyme inhibitor: aromatase, 17,20-lyase			< 16 µg/L VTG male increase 64 µg/L sex ratio => male	decrease VTG
Acrylic acid	79-10-7		-			
Cyclophosphamide	50-18-0		-			
Glutaraldehyde	111-30-8		-			
Chloroform	67-66-3		-			
Acrolein	107-02-8		-			
Toluene	108-88-3		-			
1,1-Dichloro-1-fluoroethane	1717-00-6		-			
Methyl tertiary butyl ether	1634-04-4		-			
Isopropanol	67-63-0		-			
Styrene, Monomer	100-42-5		-			
Styrene Oligomer (Dimer, Trimer)			-			
Caffeine	58-08-2		-			
Carbon disulfide	75-15-0		-			
Tetrahydrofuran	109-99-9		-			
Zinc chloride	7646-85-7		-			
Hydrogen sulfide	7783-06-4		-			

Tabelle 39: Vergleich von *in vivo* Effekten ausgewählter Modellsubstanzen in Säugetiertestungen mit Effekten aus *in vitro* Testungen

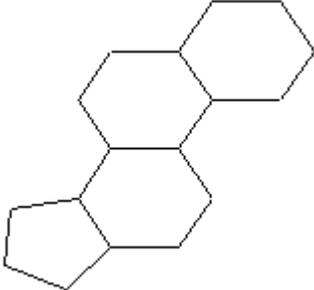
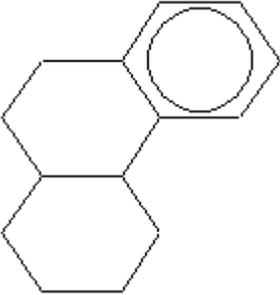
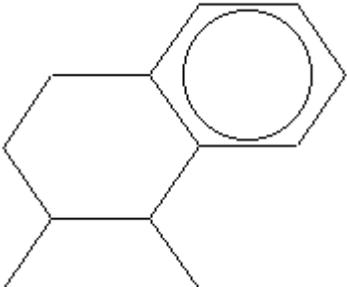
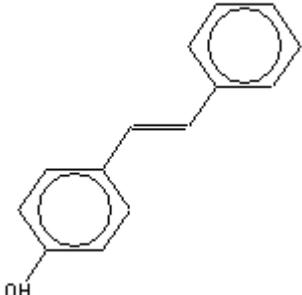
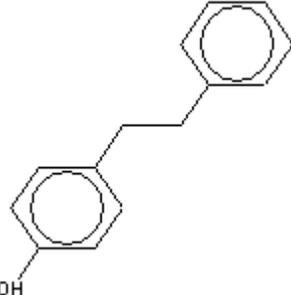
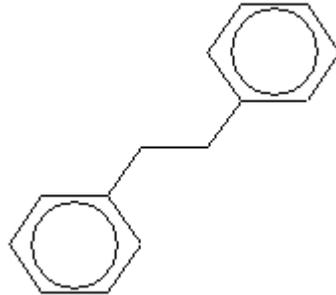
Reproductive toxicology database				Reportergergen-Test (Zelltests) Relative potency to positive control				Receptor binding studies Relative potency to positive control	
compound	CAS	Mechanism	in vivo EDC effect ?	ER Agonist	ER Antagonist	AR Agonist	AR antagonist	ER	AR
17-alpha Ethinylestradiol	57-63-6	ER agonist	+	strong				strong	
17-beta Estradiol	50-28-2	ER agonist	+	strong	no	strong	strong	strong	yes
Diethylstilbestrol	56-53-1	selective ER agonist and antagonist	+	strong		no		strong	weak
Tamoxifen	10540-29-1	selective ER agonist and antagonist	+	weak		no	weak	strong	weak
Raloxifene	82640-04-8	selective ER agonist and antagonist	+	weak	no				
Nonylphenol	25154-52-3	ER agonist	+	weak	no	no / weak	no / weak	weak	no
Genistein	446-72-0	ER agonist, enzyme inhibitor: aromatase	+	weak		no		yes	marginal
p,p'-DDT	50-29-3	ER agonist	+	weak		no	weak	no	
Testosterone propionate	57-85-2	AR agonist	+			strong		no	
Methyl testosterone	58-18-4	AR agonist							
17 beta-Trenbolone	10161-33-8	AR agonist	+			yes			
Vinclozolin (incl. metabolites)	50471-44-8	AR antagonist, possible thyroid modulator	+	no		weak / no	strong	no	no
Procymidone	32809-16-8	AR antagonist	+				yes		yes
Flutamide	13311-84-7	AR antagonist	+			no	strong		
Finasteride	98319-26-7	enzyme inhibitor: 5-alpha-reductase	+			no	no		
Linuron	330-55-2	AR antagonist, enzyme inhibitor: aromatase	+				weak		yes
Thyroxine	51-48-9	thyroidal hormone, natural agonist	+						
Propylthiouracil	51-52-5	thyreostatic, enzyme inhibitor: peroxidase	+						
Ammonium perchlorate	7790-98-9	thyreostatic, enzyme inhibitor: iodide transport	+						
Butyl benzyl phthalate	85-68-7		+/?	weak			weak	no	
Lindane	58-89-9		+/?				weak	no	
Bisphenol A	80-05-7	ER agonist	+/?	weak		no	yes / weak / no	weak	weak
2,4-Dichlorophenol	120-83-2		+/?	yes / no			weak	weak / negative	
Benzophenone-3	131-57-7			weak	no	weak	weak	no	
Benzophenone	119-61-9		+/?				weak		
1-Bromopropane	106-94-5		+/?						
2-Bromopropane	75-26-3		+/?						
Di-(2-ethylhexyl) phthalate	117-81-7		+/?						
4-tert-Pentylphenol									
4-tert-Octylphenol	140-66-9			weak			yes	weak	

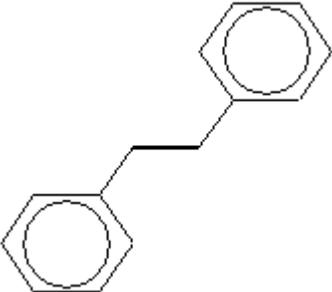
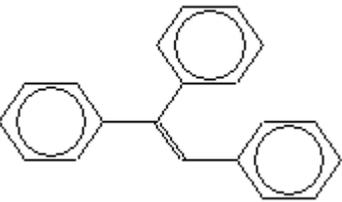
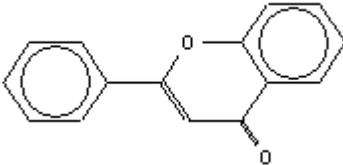
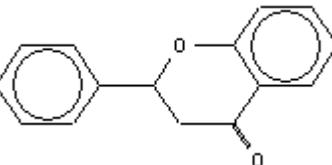
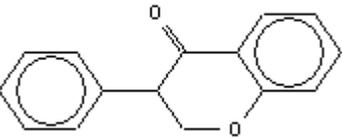
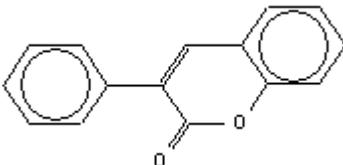
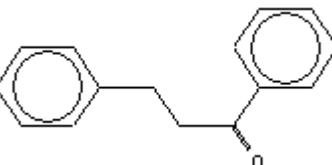
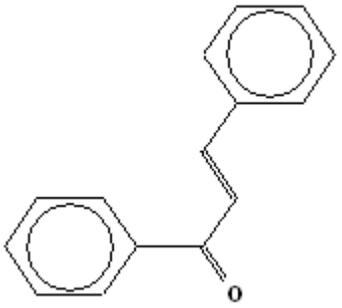
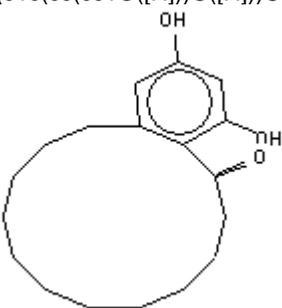
Reproductive toxicology database				Reporter-Gen-Test (Zelltests) Relative potency to positive control				Receptor binding studies Relative potency to positive control	
compound	CAS	Mechanism	in vivo EDC effect ?	ER Agonist	ER Antagonist	AR Agonist	AR antagonist	ER	AR
4-Nonylphenol	84852-15-3		+/?	weak		weak	yes	weak	
Pentachlorophenol	87-86-5		+/?			no	no		
Nitrobenzene	98-95-3		+/?						
Ethylbenzene	100-41-4		+/?						
Dibromoacetic acid	631-64-1		+/?						
Zearalenone	17924-92-4		+/?	weak					
Tributyltin chloride	1461-22-9	anti-androgen, possible enzyme inhibitor: aromatase	+/?						
Prochloraz (DMI fungicide)	67747-09-5	aromatase inhibitor							
Acrylic acid	79-10-7		-						
Cyclophosphamide	50-18-0		-						
Glutaraldehyde	111-30-8		-						
Chloroform	67-66-3		-						
Acrolein	107-02-8		-						
Toluene	108-88-3		-				no		
1,1-Dichloro-1-fluoroethane	1717-00-6		-						
Methyl tertiary butyl ether	1634-04-4		-						
Isopropanol	67-63-0		-						
Styrene, Monomer	100-42-5		-				no	no	
Styrene Oligomer (Dimer, Trimer)	80-46-6			no				yes / no	
Caffeine	58-08-2		-						
Carbon disulfide	75-15-0		-						
Tetrahydrofuran	109-99-9		-						
Zinc chloride	7646-85-7		-						
Hydrogen sulfide	7783-06-4		-						

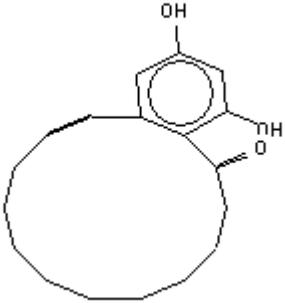
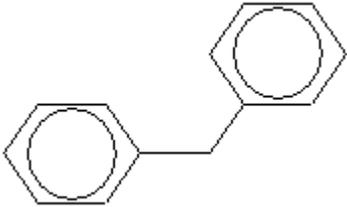
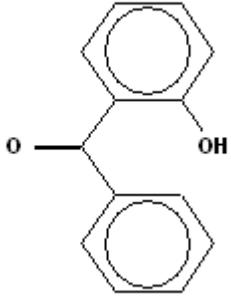
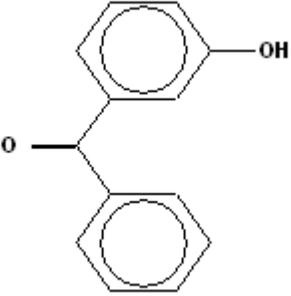
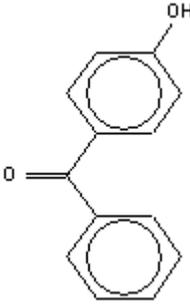
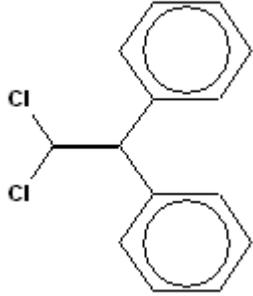
Grünes Feld *in vitro* = Übereinstimmung zwischen *in vivo* und *in vitro* Aussagen

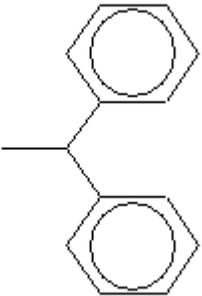
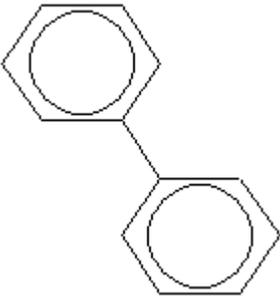
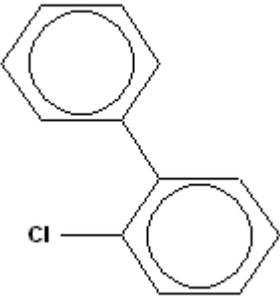
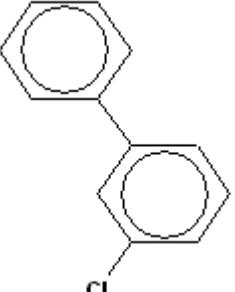
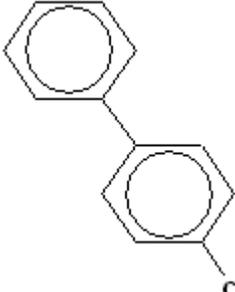
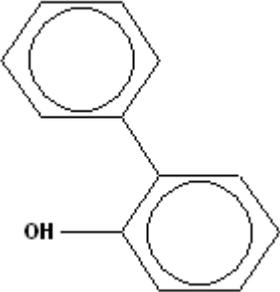
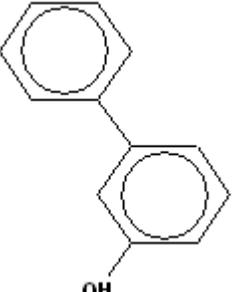
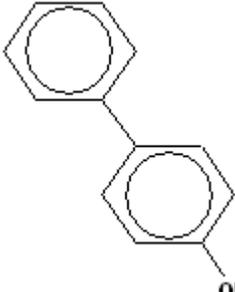
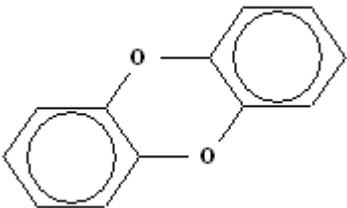
Weißes Feld *in vitro* = keine Übereinstimmung zwischen *in vivo* und *in vitro* Aussagen oder keine Daten

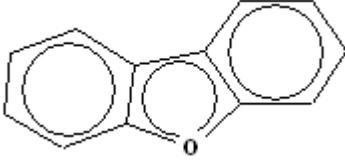
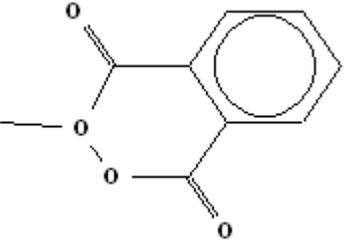
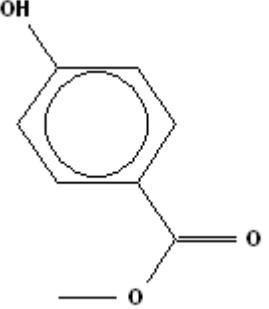
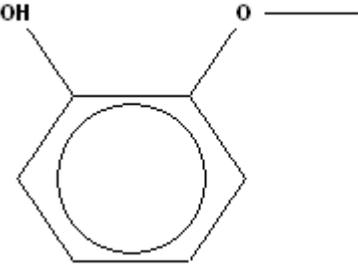
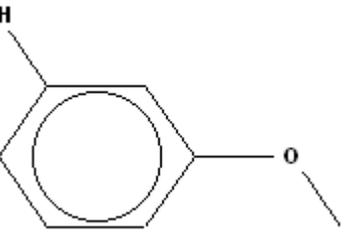
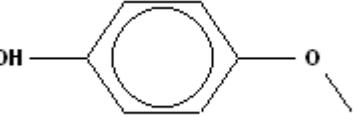
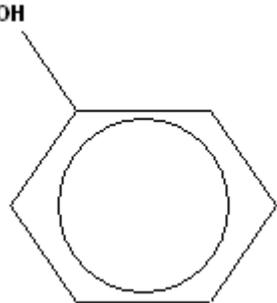
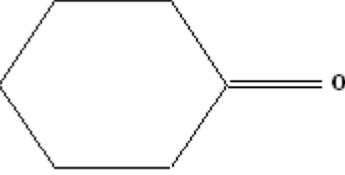
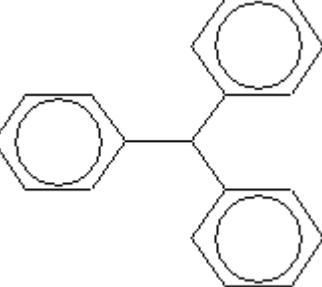
Tabelle 40: Definition der Kandidaten für structural alerts
 (nicht alle werden verwendet, siehe Tabelle 14)

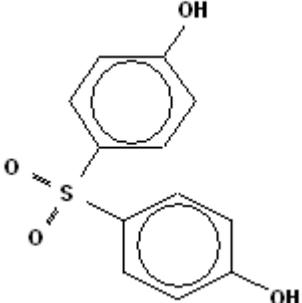
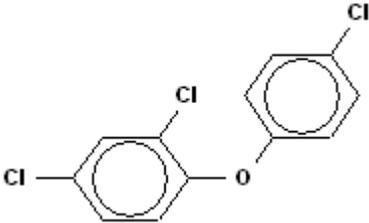
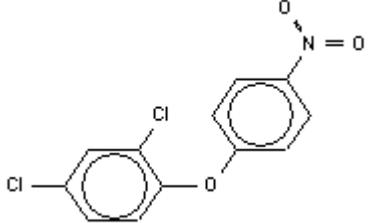
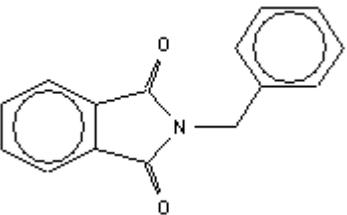
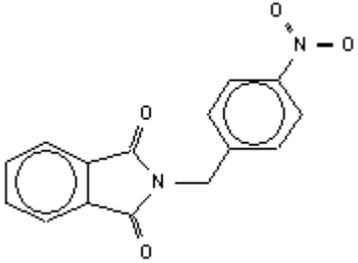
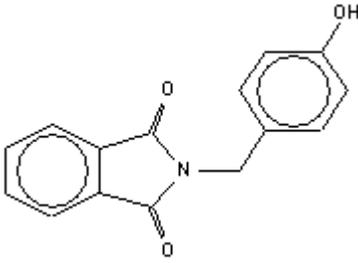
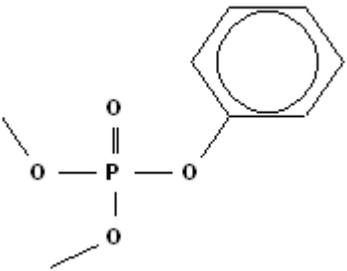
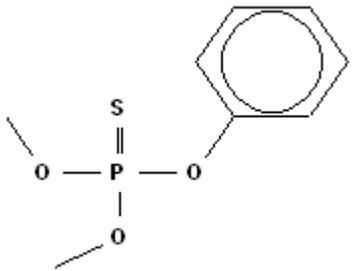
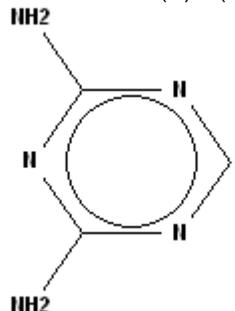
<p>Name: s.a. 01 SMILES-Code: <chem>C1CCC4C(C1)C2C(C3C(CC2)CCC3)CC4</chem></p> 	<p>Name: s.a. 02 SMILES-Code: <chem>c1ccc3c(c1)C2C(CCCC2)CC3</chem></p> 	<p>Name: s.a. 03 SMILES-Code: <chem>c1ccc2c(c1)C(C(C)CC2)C</chem></p> 
<p>Name: s.a. 04 SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)C=Cc2ccc(cc2)O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 05 SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)CCc2ccc(cc2)O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 06a SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)CCc2ccccc2</chem></p> 

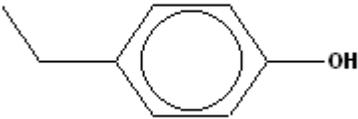
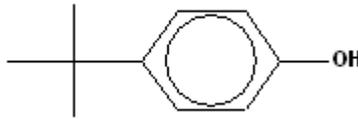
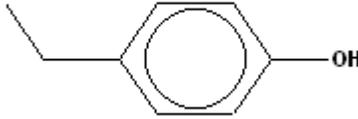
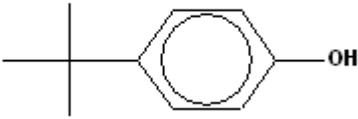
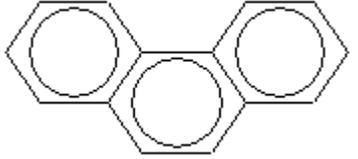
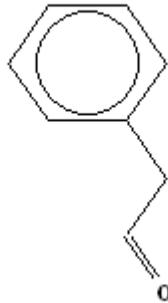
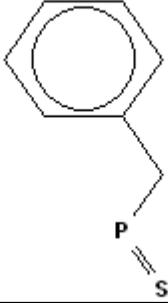
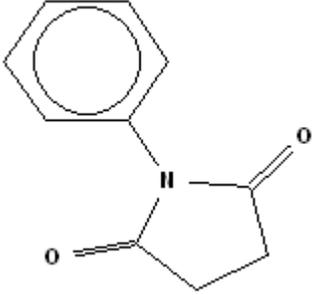
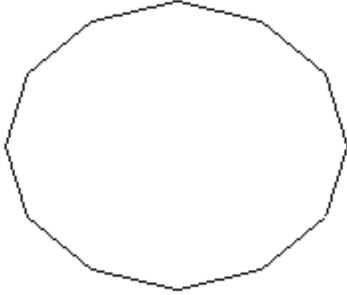
<p>Name: s.a. 06b SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)C=Cc2ccccc2</chem></p> 	<p>Name: s.a. 07 SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)C(=Cc2ccccc2)c3ccccc3</chem></p> 	<p>Name: s.a. 08 SMILES-Code: <chem>C3(c1ccccc1)Oc2c(cccc2)C(C=3)=O</chem></p> 
<p>Name: s.a. 09 SMILES-Code: <chem>C3(c1ccccc1)Oc2c(cccc2)C(C3)=O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 10 SMILES-Code: <chem>C3(c1ccccc1)C(c2c(cccc2)OC3)=O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 11 SMILES-Code: <chem>C3(c1ccccc1)=Cc2c(cccc2)OC3=O</chem></p> 
<p>Name: s.a. 12 SMILES-Code: <chem>C(c1ccccc1)CC(c2ccccc2)=O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 12b SMILES-Code: <chem>O=C(c(cccc1)c1)C=Cc(cccc2)c2</chem></p> 	<p>Name: s.a. 13a SMILES-Code: <chem>C2C(c1c(cc(cc1O([H]))O([H]))CCCCCCCCC2)=O</chem></p> 

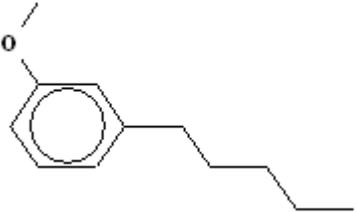
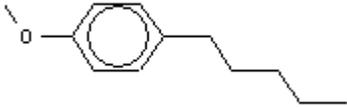
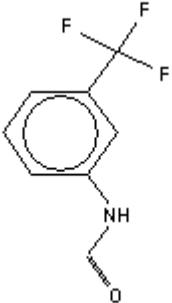
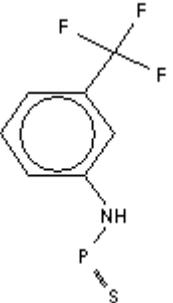
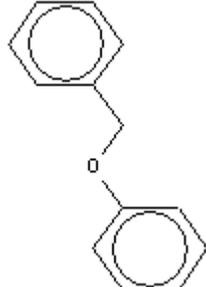
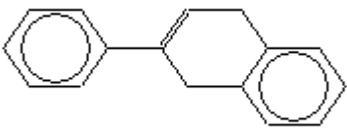
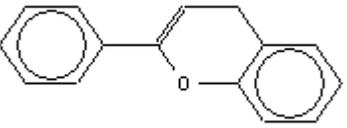
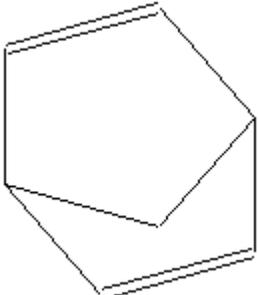
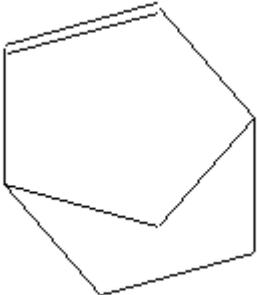
<p>Name: s.a. 13b SMILES-Code: <chem>C2C(c1c(cc(cc1O([H]))O([H]))C=CCCCCCCC2)=O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 14 SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)Cc2ccccc2</chem></p> 	<p>Name: s.a. 15a SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1O([H]))C(c2ccccc2)=O</chem></p> 
<p>Name: s.a. 15b SMILES-Code: <chem>c1(cccc(c1)C(c2ccccc2)=O)O[H]</chem></p> 	<p>Name: s.a. 15c SMILES-Code: <chem>c1c(ccc(c1)C(c2ccccc2)=O)O[H]</chem></p> 	<p>Name: s.a. 16 SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)C(c2ccccc2)=C(Cl)Cl</chem></p> 

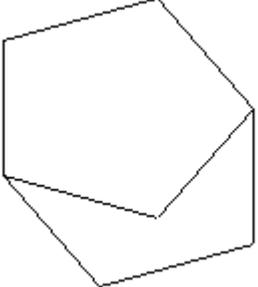
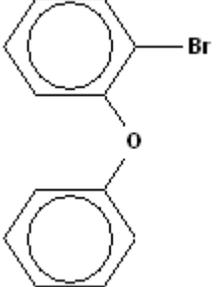
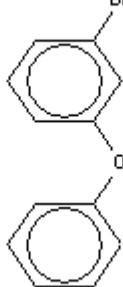
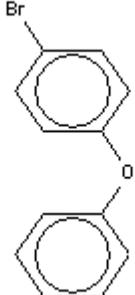
<p>Name: s.a. 17 SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)C(c2ccccc2)C</chem></p> 	<p>Name: s.a. 18 SMILES-Code: <chem>c1ccccc1c2ccccc2</chem></p> 	<p>Name: s.a. 19a SMILES-Code: <chem>c1ccccc1c2c(cccc2)Cl</chem></p> 
<p>Name: s.a. 19b SMILES-Code: <chem>c1ccccc1c2cc(ccc2)Cl</chem></p> 	<p>Name: s.a. 19c SMILES-Code: <chem>c1ccccc1c2ccc(cc2)Cl</chem></p> 	<p>Name: s.a. 20a SMILES-Code: <chem>c1ccccc1c2c(cccc2)O[H]</chem></p> 
<p>Name: s.a. 20b SMILES-Code: <chem>c1ccccc1c2cc(ccc2)O[H]</chem></p> 	<p>Name: s.a. 20c SMILES-Code: <chem>c1ccccc1c2ccc(cc2)O[H]</chem></p> 	<p>Name: s.a. 21 SMILES-Code: <chem>c1ccc2c(c1)Oc3c(O)cccc3</chem></p> 

<p>Name: s.a. 22 SMILES-Code: <chem>c1ccc2c(c1)oc3c2cccc3</chem></p> 	<p>Name: s.a. 23 SMILES-Code: <chem>c1ccc(c(c1)C(OC)=O)C(=O)OC</chem></p> 	<p>Name: s.a. 24 SMILES-Code: <chem>c1cc(ccc1C(OC)=O)O[H]</chem></p> 
<p>Name: s.a. 25a SMILES-Code: <chem>c1c(c(ccc1)O([H]))OC</chem></p> 	<p>Name: s.a. 25b SMILES-Code: <chem>O(C)c1cc(ccc1)O[H]</chem></p> 	<p>Name: s.a. 25c SMILES-Code: <chem>O(C)c1ccc(cc1)O[H]</chem></p> 
<p>Name: s.a. 26 SMILES-Code: <chem>c1cc(ccc1)O[H]</chem></p> 	<p>Name: s.a. 27 SMILES-Code: <chem>C1(=O)CCCCC1</chem></p> 	<p>Name: s.a. 28 SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)C(c2ccccc2)c3ccccc3</chem></p> 

<p>Name: s.a. 29 SMILES-Code: <chem>c1c(ccc(c1)S(=O)(=O)O([H]))(=O)=O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 30a SMILES-Code: <chem>c1c(ccc(c1)Oc2c(cc(cc2)Cl)Cl)Cl</chem></p> 	<p>Name: s.a. 30b SMILES-Code: <chem>c1c(ccc(c1)Oc2c(cc(cc2)Cl)Cl)N(=O)=O</chem></p> 
<p>Name: s.a. 31a SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)CN2C(=O)c3ccccc3=O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 31b SMILES-Code: <chem>c1c(ccc(c1)CN2C(=O)c3ccccc3=O)N(=O)=O</chem></p> 	<p>Name: s.a. 31c SMILES-Code: <chem>c1c(ccc(c1)CN2C(=O)c3ccccc3=O)O</chem></p> 
<p>Name: s.a. 32a SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)OP(=O)(OC)OC</chem></p> 	<p>Name: s.a. 32b SMILES-Code: <chem>c1cccc(c1)OP(=S)(OC)OC</chem></p> 	<p>Name: s.a. 33 SMILES-Code: <chem>c1nc(N)nc(N)n1</chem></p> 

<p>Name: s.a. 34a SMILES-Code: <chem>[H]Oc1ccc(C([H])C)cc1</chem></p> 	<p>Name: s.a. 34b SMILES-Code: <chem>[H]Oc1ccc(C(C)(C)C([H]))cc1</chem></p> 	<p>Name: s.a. 34c SMILES-Code: <chem>[H]Oc1c([H])c([H])c(C([H])C)c([H])c([H])1</chem></p> 
<p>Name: s.a. 34d SMILES-Code: <chem>[H]Oc1c([H])c([H])c(C(C)(C)C([H]))c([H])c([H])1</chem></p> 	<p>Name: s.a. 35 SMILES-Code: <chem>c(c(c(c(c1)ccc2)c2)ccc3)(c1)c3</chem></p> 	<p>Name: s.a. 36a SMILES-Code: <chem>c1ccccc1CC=O</chem></p> 
<p>Name: s.a. 36b SMILES-Code: <chem>c1ccccc1CP=S</chem></p> 	<p>Name: s.a. 37 SMILES-Code: <chem>c1ccccc1N2C(=O)CCC(=O)2</chem></p> 	<p>Name: s.a. 38 SMILES-Code: <chem>C1CCCCCCCCCCC1</chem></p> 

<p>Name: s.a. 39 SMILES-Code: <chem>CCCCC([H])c1cc(OC)ccc1</chem></p> 	<p>Name: s.a. 40 SMILES-Code: <chem>CCCCC([H])c1ccc(OC)cc1</chem></p> 	<p>Name: s.a. 41a SMILES-Code: <chem>c1c(C(F)(F)F)ccc1NC=O</chem></p> 
<p>Name: s.a. 42b SMILES-Code: <chem>c1c(C(F)(F)F)ccc1NP=S</chem></p> 	<p>Name: s.a. 43 SMILES-Code: <chem>c1ccccc1COc2ccccc2</chem></p> 	<p>Name: s.a. 44a SMILES-Code: <chem>c1ccc2CC=C(c3ccccc3)Cc2c1</chem></p> 
<p>Name: s.a. 44b SMILES-Code: <chem>c1ccc2CC=C(c3ccccc3)Oc2c1</chem></p> 	<p>Name: s.a. 45 SMILES-Code: <chem>C12C=CC(C2)C=C1</chem></p> 	<p>Name: s.a. 46 SMILES-Code: <chem>C12C=CC(C2)CC1</chem></p> 

<p>Name: s.a. 47 SMILES-Code: C12CCC(C2)CC1</p> 	<p>Name: s.a. 48a SMILES-Code: c1(Br)cccc1Oc1ccccc1</p> 	<p>Name: s.a. 48b SMILES-Code: c1c(Br)cccc1Oc1ccccc1</p> 
<p>Name: s.a. 48c SMILES-Code: c1cc(Br)ccc1Oc1ccccc1</p> 	<p>Name: s.a. 49 SMILES-Code: c12ccccc2CCC1</p> 