



Publikationen des  
Umweltbundesamtes

**Charakterisierung  
endokrin vermittelter  
Wirkungen in Fischen:  
Relevante Parameter für  
die Entwicklung einer  
neuen OECD-Testmethode  
und die Anwendung in der  
gesetzlichen  
Umweltrisikobewertung**

Forschungsprojekt im Auftrag des  
Umweltbundesamtes  
FuE-Vorhaben  
Förderkennzeichen 206 67 470

**Matthias Teigeler  
Thomas Knacker  
Christoph Schäfers**

September 2007

**Umwelt  
Bundes  
Amt**   
Für Mensch und Umwelt



**Fraunhofer** Institut  
Molekularbiologie und  
Angewandte Oekologie

# **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**

## **Auftragnehmer:**

Thomas Knacker, ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim am Main

Christoph Schäfers, Fraunhofer IME, Schmallenberg

Matthias Teigeler, Fraunhofer IME, Schmallenberg

Thomas Braunbeck, Zoologie Universität Heidelberg

## **Autoren:**

Matthias Teigeler, Thomas Knacker, Christoph Schäfers

September 2007

Im Auftrag des Umweltbundesamtes Dessau, Deutschland

## Berichts-Kennblatt

<b>1. Berichtsnummer</b> UBA-FB 206 67 470	2.	3.
<b>4. Titel des Berichts</b> Charakterisierung endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen: Relevante Parameter für die Entwicklung einer neuen OECD-Testmethode und die Anwendung in der gesetzlichen Umweltrisikobewertung		
<b>5. Autor(en), Name(n), Vorname(n)</b> Teigeler, Matthias; Knacker, Thomas; Schäfers, Christoph		<b>8. Abschlussdatum</b> 30.11.2007
		<b>9. Veröffentlichungsdatum</b>
<b>6. Durchführende Institution (Name, Anschrift)</b> ECT Oekotoxikologie GmbH, Böttgerstr. 2-14, 65439 Flörsheim am Main Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg		<b>10. UFOPLAN-Nr.</b> 206 67 470
		<b>11. Seitenzahl</b> 93
<b>7. Fördernde Institution (Name, Anschrift)</b> Umweltbundesamt, Wörlitzer Platz 1, 06844 Dessau		<b>12. Literaturangaben</b> 26
		<b>13. Tabellen und Diagramme</b> 6
		<b>14. Abbildungen</b> 2
<b>15. Zusätzliche Angaben</b> Dieses Vorhaben wurde im Auftrag des Umweltbundesamtes erstellt und mit Bundesmitteln finanziert.		
<b>16. Kurzfassung</b> Die bisher vorliegenden Anwendungserfahrungen von Lebenszyklus-Studien mit Fischen bei endokrin wirksamen Substanzen wurden gesammelt und verglichen, 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 FLCT 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. Auf der Grundlage der Resultate wurde ein Vorschlag für eine gestufte Teststrategie für potenziell sexual-endokrin wirkende Stoffe vorgelegt. Für Interaktionen mit dem Östrogenrezeptor (ÖR) 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, ausreichend empfindliche Biomarker wurden nicht untersucht. 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 Dickkopflritze mit einer Verweiblichung auf ÖR-Agonisten, während der protogyne Zebrafisch mit einer Verzögerung oder Hemmung der männlichen Entwicklung reagiert; auf Aromatase-Hemmer scheint der Zebrafisch empfindlicher mit einer Vermännlichung zu reagieren, während die Dickkopflritze 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. Ein Early Life Stage oder Juvenile Growth Test kann für DMI-Fungizide eine ausreichend sichere Extrapolation auf FLCT-Ergebnisse ermöglichen, um eine vorläufige Risikobewertung im Zulassungsverfahren vorzunehmen.		
<b>17. Schlagwörter</b> Fish Full Life Cycle Test, Fish Screening Assay, Biomarker, populationsrelevante Endpunkte		
<b>18. Preis</b> 29 688,22 €	<b>19.</b>	<b>20.</b>

## Report Cover Sheet

<b>1. Report No</b> UBA-FB 206 67 470	<b>2.</b>	<b>3.</b>
<b>4. Report Title</b> Characterisation of endocrine mediated impacts on fish. Relevant parameters for the development of a new OECD test method and the application in regulatory environmental risk assessment		
<b>5. Author(s), Name(s), First Name(s)</b> Teigeler, Matthias; Knacker, Thomas; Schäfers, Christoph		<b>8. Report Date</b> 30.11.2007
		<b>9. Publication Date</b>
<b>6. Performing Organisation (Name, Address)</b> ECT Oekotoxikologie GmbH, Böttgerstr. 2-14, 65439 Flörsheim am Main Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg		<b>10. UFOPLAN Ref.No.</b> 206 67 470
		<b>11. No of Pages</b> 93
<b>7. Sponsoring Agency (Name, Address)</b> Umweltbundesamt, Wörlitzer Platz 1, 06844 Dessau		<b>12. No of Referenes</b> 26
		<b>13. No of Tables</b> 6
		<b>14. No of Figures</b> 2
<b>15. Supplementary Notes</b> This study was commissioned by the German Federal Environment Agency and supported with federal funds.		
<b>16. Abstract</b> Scope of the study was the collection and comparison of existing experience with fish full life cycle studies on endocrine disrupting chemicals to derive general conclusions about endpoint sensitivity and help reducing uncertainties in the assessment. Characteristic population relevant and indicative endpoints for relevant direct sexual endocrine Modes of Action (MoA) were identified and compared for sensitivity. The data base consisted of Full Life Cycle Tests (FLCT) and two-generation tests by the Fraunhofer IME and from literature. Based on the results, test data from the UBA regulatory data base were tried to classify. In the second part, biomarker data from Fish Screening Assays (FSA) were compared with the effect data from population relevant FLCT endpoints and assessed according to sensitivity and predictive potential to derive a proposal for a tiered test strategy for potentially endocrine disrupting chemicals. The most sensitive exposure period for interactions with the estrogen receptor (ER) is the sexual development phase. The most sensitive manifestation endpoint is the reduction of the fertilization rate, the sensitivity of juvenile growth and sex manifestation being very close. The vitellogenin (VTG) measurement in a FSA is comparably sensitive. When using it as a lower tier test, a false negative result is not expected. Androgen receptor-(AR-) interactions have to be differentiated in the agonistic and antagonistic MoA. For both, VTG is not always a powerful biomarker. Fecundity is the most sensitive population relevant endpoint for the investigated AR antagonist; the most sensitive indicative endpoint in the FSA and the two-generation test is the enhanced sexual steroid 11-keto-testosterone. Regarding the AR agonists, sexual development is the most sensitive exposure period, the sex ratio being the most sensitive endpoint. Sufficiently sensitive biomarkers were not identified. Sexual development is also the most sensitive exposure period for aromatase inhibitors, becoming manifest in different endpoints with close sensitivity: the shift towards males in sex ratio, growth retardation or fecundity. VTG reduction was sensitive in the definitive tests as well as in the FSA. The investigated fish species were principally comparably sensitive towards hormone receptor interaction. The manifestation of effects may differ, i.e., in Medaka and Fathead Minnow, ER agonists cause femalization, whereas Zebrafish are arrested in their male protogyne development phase; zebrafish seem to be more sensitive to masculinisation by aromatase inhibition, whereas Fathead minnow seems to be more sensitive in a reduction of juvenile growth. Whether a two-generation test should be performed instead of a FLCT depends on the relevance of maternal effect transfer and could not be clarified due to a lack of comparable data. For using a shortened test procedure instead of a FLCT or two-generation test, precise information about the MoA is necessary as well as evidence on whether the shortened protocol is appropriate to cover the most sensitive exposure period and the most sensitive population relevant endpoint. Partial life cycle tests, such as short-term reproduction tests, thus can never be appropriate. The Fish Sexual Development Test (FSDT) could be the adequate test for AR agonists and aromatase inhibitors. The Early Life Stage or Juvenile Growth Test can be used for DMI-fungicides for a sufficiently safe extrapolation to FLCT results to perform a preliminary regulatory risk assessment.		
<b>17. Key Words</b> Fish Full Life Cycle Test, Fish Screening Assay, biomarker, population relevant endpoints		
<b>18. Price</b> 29,688.22 €	<b>19.</b>	<b>20.</b>

**Inhaltsverzeichnis**

<b>LISTE DER ABKÜRZUNGEN</b>	<b>3</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>4</b>
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	<b>7</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
1.1 Endpunkte sexual-endokriner Wirkungen	10
1.2 Hintergrund und Ziel des Vorhabens	11
1.3 Rahmenbedingungen des Vorhabens	12
1.3.1 Forschungsnehmer und Ablauf des Vorhabens	12
1.3.2 Fachgespräch	12
<b>2 THEORETISCHER HINTERGRUND</b>	<b>13</b>
2.1 Direkte Wirkmechanismen sexual-endokriner Wirkung	13
2.2 Endpunkte sexual-endokriner Wirkung	13
2.2.1 Endpunkte mit Populationsrelevanz	13
2.2.2 Indikative Endpunkte	14
2.3 Methodik zur Erfassung	15
2.3.1 Testverfahren	15
2.3.2 Verwendete Fischarten	17
2.4 Verwendetes Datenmaterial	18
2.4.1 Daten aus Studien am Fraunhofer IME	19
2.4.2 Daten aus Literatur	20
2.4.3 Datenmaterial Umweltbundesamt	21
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>21</b>
3.1 Endpunktvergleich aus Full Life Cycle und Zwei-Generationen-Tests	22
3.1.1 Östrogen Rezeptor Agonist/Antagonisten	23
3.1.2 Östrogenrezeptor-Antagonist	30

3.1.3 Androgenrezeptor-Agonisten	31
3.1.4 Androgenrezeptor-Antagonisten	33
3.1.5 Aromatase-Hemmer	34
3.1.6 Inhibitor der Testosteron-Synthese (basale Steroidsynthese)	36
<b>3.2 Einordnung der Daten des Umweltbundesamtes</b>	<b>37</b>
3.2.1 Datensatz FLCT, Wirkmechanismus unklar	37
3.2.2 Datensatz DMI Fungizide	38
<b>3.3 Vergleich der Ergebnisse mit Daten aus Kurzzeit-Tests (FSA)</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Ableitung einer Teststrategie für Fische</b>	<b>48</b>
<b>4 ZUSAMMENFASSEND BEANTWORTUNG DER PROJEKT- FRAGESTELLUNGEN</b>	<b>50</b>
<b>5 LITERATUR</b>	<b>63</b>
<b>6 ANHÄNGE</b>	<b>65</b>
Anhang 1: Endpunktvariabilität in FLCT mit dem Zebraäbrbling-Stamms des Fh-IME	66
Anhang 2: Verwendete Studien aus der Literatur	79
Anhang 3: Protokoll des Fachgespräches	83

**Dieses Vorhaben wurde im Auftrag des Umweltbundesamtes im Rahmen des Umweltforschungsplanes – Förderkennzeichen 206 67 470 – erstellt und mit Bundesmitteln finanziert.**

## Liste der Abkürzungen

11 kT	11-keto-Testosteron
ACR	Acute Chronic Ratio
AR	Androgen-Rezeptor
BPA	Bisphenol A
DMI	Demethylase-Inhibitor
EE2	Ethinylöstradiol
EU	Europäische Union
EC <sub>50</sub>	50 % Effekt-Konzentration
EDC	Endocrine Disrupting Compounds
FLCT	Full Life Cycle Test
FSA	Fish Screening Assay
FSDT	Fish Sexual Development Test
GSI	Gonado-somatischer Index
LC <sub>50</sub>	50 % letale Konzentration
MOA	Mode of Action, Wirkmechanismus
NOEC	No Observed Effect Concentration
NP	Nonylphenol
ÖR	Östrogen-Rezeptor
OP	Octylphenol
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PEC	Predicted Environmental Concentration
PLCT	Partial Life Cycle Test
UBA	Umweltbundesamt
VTG	Vitellogenin

## Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Unsicherheit, mit der die Bewertung von Lebenszyklus-Studien mit Fischen behaftet ist, sollte im Rahmen der vorliegenden Studie durch eine systematische Sammlung und Auswertung vorhandener Daten reduziert werden.

Im ersten Teil der Studie bestand die Aufgabe darin, populationsrelevante und indikative Endpunkte für sexual-endokrine Wirkmechanismen herauszuarbeiten und deren Empfindlichkeiten miteinander zu vergleichen. Dabei wurden direkte Interaktionen mit Östrogen- oder Androgenrezeptoren (Agonismen und Antagonismen) sowie spezifische Hemmungen wichtiger Steroidsynthese-Enzyme zu unterscheiden versucht. Als Basis diente Datenmaterial aus Full Life Cycle Tests (FLCT) und Zwei-Generationen-Tests des Fraunhofer IME und aus der Literatur. Anhand der Ergebnisse wurde anschließend versucht, Studiendaten aus FLCT aus der Datenbank des Umweltbundesamtes mit diesbezüglich unbekanntem Wirkmechanismus hinsichtlich potenziell sexual-endokriner Wirkungen einzuordnen.

Im zweiten Teil der Studie wurden Biomarker-Messungen aus Fish Screening Assays (FSAs) den Effektdaten von populationsrelevanten Endpunkten aus FLCT gegenübergestellt und bezüglich Empfindlichkeit und Vorhersagepotenzial bewertet. Auf Grundlage der Resultate wurde ein Vorschlag für eine gestufte Teststrategie für potenziell sexual-endokrin wirkende Stoffe vorgelegt.

Aus dem Datenmaterial lassen sich zur Empfindlichkeit unterschiedlicher populationsrelevanter und indikativer Endpunkte folgende Aussagen ableiten, die sich allerdings nur für die Wirkmechanismen Östrogen-Rezeptor-Anregung und Aromatase-Hemmung auf eine sichere Breite verwendeter Substanzen, Testmethoden und Fischarten stützen kann:

Für Interaktionen mit dem Östrogenrezeptor stellt die Sexualentwicklung das empfindlichste Expositionsfenster da. Eine sexual-endokrine Wirkung manifestiert sich am empfindlichsten im Reproduktionsparameter Befruchtungsrates. Ein FSA mit Erfassung der Blutkonzentration des Eidottervorläuferproteins Vitellogenin als



Wirkindikator reagiert vergleichbar empfindlich und lässt keine falsch negativen Ergebnisse erwarten. Empfindlichstes Expositionsfenster und empfindlichstes Manifestationsstadium sind nur in einem FLCT als Endstufetest zu erfassen.

Allerdings liegen die Sensitivitäten von Wachstum und Geschlechtsentwicklung sowie Reproduktion nah beieinander. Diese Aussagen sind für agonistische Wirkweisen gut belegt und leicht belegbar, weil durch den Agonisten in beiden Geschlechtern induzierte erhöhte

Vitellogeninkonzentrationen vor allem im Blut exponierter Männchen leicht und empfindlich nachweisbar sind. Eine durch Antagonisten verursachte Abnahme der Vitellogeninkonzentration ist dagegen schwieriger und im Wesentlichen in Weibchen nachzuweisen, da die Vitellogeninlevel in Männchen ohnehin sehr niedrig sind. Hier deuten die wenigen verfügbaren Daten darauf hin, dass die oben gemachte Aussage zutrifft, müssten aber noch durch weitere Belege unterstützt werden.

Die Androgenrezeptor-Interaktionen müssen nach agonistischer und antagonistischer Wirkweise getrennt werden. Der empfindlichste populationsrelevante Endpunkt für den untersuchten AR-Antagonisten ist die Reproduktion in Form der Fekundität. Empfindlicher indikativer Endpunkt im FSA und Zwei-Generationen-Test ist das Sexualsteroid 11-keto-Testosteron, während Vitellogenin nicht aussagekräftig ist. Das empfindlichste Expositionsfenster ist auf Basis eines Durchflusstests schwierig abzuschätzen. Da sich die Wirkung in der Fekundität manifestierte, wahrscheinlich durch den Ausfall männlichen Balzverhaltens verursacht wurde und bei Konzentrationsrückgängen im Test reversibel war, kann dies als Hinweis auf die Reproduktionsphase als empfindlichstes Expositionsfenster gedeutet werden.

Bezüglich der AR-Agonisten ist die Sexualentwicklung das empfindlichste Expositionsfenster und das Geschlechterverhältnis der sensitivste Endpunkt. Die untersuchten Biomarker sind für diesen Wirkmechanismus nicht immer ausreichend empfindlich.

Für die Aromatase-Inhibitoren stellt die Sexualentwicklung ebenfalls das empfindlichste Belastungsfenster dar. Eine sexual-endokrine Wirkung manifestiert sich am empfindlichsten in unterschiedlichen Endpunkten, deren Empfindlichkeit in den untersuchten Tests in allen sechs valide vergleichbaren Fällen maximal um den Faktor drei auseinander lag: In einer Verschiebung des Geschlechterverhältnisses,

einer Reduktion der Eizahl oder in Wachstumsverzögerungen. In den wenigen vorliegenden FSAs reagierte die Abnahme von Vitellogenin in Weibchen als Wirkindikator ähnlich empfindlich.

Eine Identifikation eines Verdachts auf sexual-endokrine Wirkung muss auch den Hinweis auf den/die wahrscheinlichsten Wirkmechanismen enthalten, um die weitere Prüfstrategie richtig fokussieren zu können. Als erste *in-vivo*-Stufe zeigen Ergebnisse der nach dem FSA Richtlinienentwurf durchgeführten Versuche mit Ausnahme der den Androgenrezeptor (AR) betreffenden Wirkmechanismen für alle anderen Wirkmechanismen ausreichend empfindlich Wirkungen an, um direkt die Durchführung eines definitiven Tests für die Risikobewertung triggern zu können. Für AR-Antagonisten steht in 11-keto-Testosteron ein Biomarker mit ausreichender Empfindlichkeit zur Verfügung, für AR-Agonisten wird ein solcher noch gesucht. Für alle Fälle gilt: Eine Reduktion des zur abschließenden Risikobewertung ausreichenden Testverfahrens auf eine im Vergleich zum 2-Generationen Test oder FLCT kürzeren Variante ist nur bei einem eindeutig geklärten Wirkmechanismus möglich. Die Frage, ob ein FLCT oder ein 2-Generationen-Test notwendig ist, hängt davon ab, wie maternale Effekte bewertet werden. Das vorliegende Datenmaterial konnte zur Erkennung von und der Beurteilung der Empfindlichkeit maternaler Effekte zumeist nicht herangezogen werden und reicht damit keinesfalls für angemessen verlässliche und allgemeingültige Aussagen über die Relevanz solcher transgenerationalen Wirkungen aus. Nur in einigen Fällen (Aromatase-Inhibition) gab es Hinweise aus Versuchen mit verschiedenen Expositionsfenstern, die nicht für eine Absenkung des regulatorisch relevanten NOEC durch maternale Effekte sprachen.

## Summary and Conclusions

The scope of the present study is the reduction of uncertainty in assessing Fish Full Life Cycle Tests (FLCT) by a systematic collection and evaluation of existing data.

In the first part, we focussed on detecting population relevant and indicative endpoints specific for sexual-endocrine modes of action (MoA), comparing them with regard to sensitivity. For this, the direct sexual-endocrine effects were pragmatically classified as interactions with the estrogen or androgen receptor (agonisms or antagonisms) or as inhibitions of the steroid synthesis (basic steroid synthesis or aromatase inhibition). The data base consisted of FLCT and two-generation tests by the Fraunhofer IME and from literature. Based on the results of the evaluation it was tried to classify FLCT data of the UBA regulatory data base with unknown MoA according to the sensitive endpoints reported with respect to potential sexual endocrine effects.

In the second part, biomarker results from Fish Screening Assays (FSAs) were compared to population relevant FLCT endpoints regarding sensitivity. The prediction capability of FSAs for NOECs of FLCTs was assessed. Based on the results, a tiered test strategy for potentially endocrine disrupting chemicals is proposed.

From the data set, the following statements can be derived regarding the sensitivity of different population relevant and indicative endpoints. However, it has to be underlined that an adequate data base concerning tested substances, fish species and applied test methods is only available for estrogen receptor agonists and aromatase inhibitors.

- For interactions with the estrogen receptor (ER) the most sensitive exposure period is the sexual development phase. A sexual endocrine effect most sensitively and specifically becomes manifest in the reproductive parameter fertilisation rate. An FSA including the determination of the blood plasma concentration of the yolk precursor protein vitellogenin (VTG) as effect indicator provides as sensitive results as the most sensitive population

relevant endpoint of the FLCT. Thus, a false negative response is not expected. The most sensitive exposure and effect manifestation periods can only be combined in an FLCT. However, the sensitivity of juvenile growth and sexual development are close to fertility, which can easily be shown for the agonistic MoA, as the induction of VTG in both sexes can powerfully be measured, particularly in exposed males. It is more difficult to detect a significant VTG reduction caused by the antagonistic MoA, which is mainly possible in females, as VTG levels in males are very low anyway. For characterising ER-antagonism effects, the data set has to be extended.

- Androgen receptor (AR) interactions have to be differentiated in the agonistic and antagonistic MoA. For the AR antagonist, the most sensitive population relevant endpoint is fecundity (spawned eggs per female). A sensitive indicative endpoint in FSA and two-generation test was the sex steroid 11-keto-testosterone, whereas VTG was not. The most sensitive exposure period cannot be derived from a flow-through test. However, as the effect became manifest in the reduced number of spawned eggs, most probably caused by the reduction of male mating behaviour, being reversible when the concentrations dropped, this can be regarded as evidence for the reproduction phase being the most sensitive exposure period. For AR agonists the sexual development phase is the most sensitive exposure period, the sex ratio being the most sensitive endpoint. The investigated biomarkers were not always appropriately sensitive.
- Aromatase inhibition causes most sensitive effects when occurring during the sexual development phase. A sexual endocrine effect becomes manifest in different endpoints, the sensitivity being as close as factor 3 in NOECs in all six valid and comparable tests: a shift in the sex ratio, a decrease of fecundity and a reduction of juvenile growth. The very few available FSA results showed comparable sensitivity of VTG reduction in females as indicative endpoint.

Consequently, the identification of a concern of sexual endocrine effects should include hints of the most probable MoA to direct the test designs and focus the test

strategy. This entrance into the test strategy was not part of the study. The first *in-vivo* tier is represented by the studies conducted according to the FSA draft guideline. The results indicate adequate sensitivity of the biomarker VTG for all MoA except the AR interactions to directly trigger the performance of a definitive test for the risk assessment. For AR antagonists 11-keto-testosterone seems to be a biomarker of appropriate sensitivity, for AR agonists a safe one still has to be identified.

Concerning the definitive test, an FLCT or two-generation test is the golden standard. The test might be reduced by focusing on the most sensitive exposure and effect manifestation periods, if the MoA is clearly identified. Whether an FLCT or a two-generation test should be conducted depends on the concern of maternal transfer of effects. The available data is not appropriate to thoroughly identify and evaluate the significance of maternal effects for the next generation and thus not suited for the derivation of valid conclusions concerning the relevance of transgenerational effects. There is some evidence from aromatase inhibitor tests with different exposure windows that impact on egg quality of exposed parental fish reduces growth performance of unexposed filial fish. However, the effects were not as sensitive as the maternal effects themselves, and thus not relevant for regulatory decisions.

# 1. Einleitung

## 1.1 Endpunkte sexual-endokriner Wirkungen

Sexual-endokrine Wirkungen können sich auf verschiedenen organismischen Systemebenen (aufsteigend die molekulare, die zelluläre, organische, organismische sowie die inter-organismische Ebene) manifestieren und unterschiedlich ausprägen. Ihre Ausprägung kann populationsrelevante Lebensleistungen betreffen, wie etwa die Geschlechtsentwicklung oder Reproduktionsleistungen wie quantitative und qualitative Fekundität und Fertilität oder das Balzverhalten. Sowohl die Manifestationsebene als auch das Zeitfenster der Manifestation ist nicht unbedingt identisch mit der Ebene oder dem Zeitfenster, die sensitiv für die Auslösung der Wirkung sind. Neben den populationsrelevanten Endpunkten können weitere Endpunkte herangezogen werden, die unterschiedlich aussagekräftige Indikatoren sexual-endokriner Wirkungen darstellen (Abb. 1).

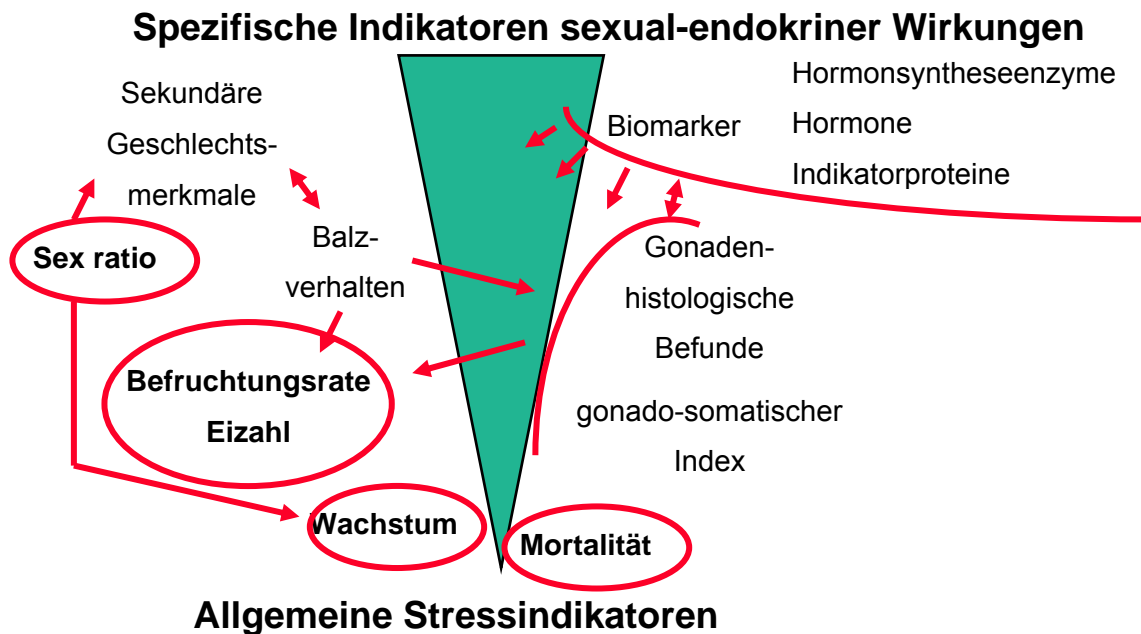


Abbildung 1: Einordnung der Wirkzusammenhänge und des Indikationswertes einzelner Endpunkte für sexual-endokrine Wirkungen

Der Indikationswert einer Wirkung, die sich an einem Endpunkt manifestiert, steigt mit Abstand zum Einfluss anderer Stressoren. So ist ein hohes Verhältnis von akuter zu chronischer Wirkung (Acute-Chronic Ratio ACR) immer ein Hinweis auf eine spezifische Wirkung. In besonderen Fällen kann selbst Mortalität als umfassendster Stressindikator auf eine spezifische Wirkung im homöostatischen Regulationssystem hindeuten, wenn die ACR für die LC50 wie im Falle von EE2 den Wert von 10 000 übersteigt.

## ***1.2 Hintergrund und Ziel des Vorhabens***

Bei der gesetzlichen Umweltrisikobewertung von Stoffen reichen Standardtestmethoden nicht aus, um Störungen des endokrinen Systems adäquat zu erfassen, da weder die populationsrelevanten, noch die indikativen Endpunkte für endokrine Wirkungen erfasst werden. Die Entwicklung geeigneter Testmethoden bildet seit einigen Jahren einen Schwerpunkt im OECD-Prüfrichtlinienprogramm. Deutschland beteiligt sich dabei u.a. an einem definitiven Langzeittest für die Charakterisierung adverser Effekte auf Reproduktion und Entwicklung von Fischen. In Einzelfällen fordern die Zulassungsbehörden jedoch bereits seit Jahren Lebenszyklus- oder Generationen-Studien mit Fischen für die Stoff- bzw. Risikobewertung, insbesondere beim Vollzug des Pflanzenschutzgesetzes. Die Unsicherheit, mit der die Bewertung dieser komplexen Studien beim derzeitigen Stand behaftet ist, soll durch eine systematische Sammlung und Auswertung der bisher vorliegenden Anwendungserfahrungen reduziert werden. Darüber hinaus sollen die Ergebnisse zu weiteren Fortschritten in der Testmethodenentwicklung (FLCT) beitragen.

Entscheidend als Selektionskriterium für die Auswahl der Fallbeispiele war die Verfügbarkeit populationsrelevanter Toxizitätsdaten gekoppelt mit einem Verdachtspotenzial auf sexual-endokrine Wirkungen. Vorhandene Studien wurden hinsichtlich der Aussagekraft der erhobenen Parameter für sexual-endokrine Wirkungen überprüft. Ausgangspunkt der Untersuchung waren Studien des Fraunhofer-IME mit Substanzen unterschiedlicher sexual-endokriner Wirkmechanismen, die um relevante Studien aus dem Datenbestand des UBA und Literaturdaten ergänzt wurden. Soweit die Datenlage dies erlaubte, waren für die unterschiedlichen sexual-

endokrinen Wirkmechanismen sowohl die Empfindlichkeit und Populationsrelevanz von Endpunkten als auch die Empfindlichkeit verschiedener Testspezies zu vergleichen. Vorgesehen war weiterhin ein Vergleich mit Daten zu denselben Stoffen aus anderen verfügbaren Fischstudien.

Ziel war die Festlegung von Kriterien für ein geeignetes Testverfahren zur definitiven Prüfung auf sexual-endokrine Wirkungen gegenüber Fischen.

### ***1.3 Rahmenbedingungen des Vorhabens***

#### **1.3.1 Forschungsnehmer und Ablauf des Vorhabens**

Das Forschungsvorhaben mit dem Förderkennzeichen 206 67 470 wurde an die Auftragnehmer ECT Oekotoxikologie GmbH (Flörsheim) zur Organisation, das Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (Schmallenberg) zur wesentlichen Bearbeitung sowie die Abteilung Zoologie der Universität in Heidelberg zur Beratung vergeben.

#### **1.3.2 Fachgespräch**

Zur Präsentation der Ergebnisse des Vorhabens wurde am 21. Juni 2007 ein Fachgespräch am Umweltbundesamt in Dessau ausgerichtet. Eingeladen waren neben Mitarbeitern des Umweltbundesamtes Vertreter der Industrie sowie Mitarbeiter aus Forschungseinrichtungen. Nach Präsentation der Ergebnisse durch die Auftragnehmer erfolgte eine Diskussion der vorgestellten Thesen.

Das Programm des Fachgespräches, eine Aufstellung der Thesen sowie ein Protokoll der Diskussion sind im Anhang 3 dieses Berichtes eingefügt.



## **2 Theoretischer Hintergrund**

### ***2.1 Direkte Wirkmechanismen sexual-endokriner Wirkung***

Um die Komplexität sexual-endokriner Wirkung übersichtlich zu machen, wurde eine Einteilung in wenige Gruppen vorgenommen. Hierzu wurden die Wirkungen zunächst in Rezeptor-Interaktionen und Steroid(hormon)-Synthesehemmungen unterteilt. Die erste Gruppe umfasst die Wirkungen, die mit einer Stimulierung oder Hemmung des Östrogen- bzw. des Androgen-Rezeptors einhergehen. Die zweite Gruppe beinhaltet die durch Enzymhemmung hervorgerufene Beeinträchtigung der Synthese von Testosteron, 11-keto-Testosteron und/oder 17-beta-Östradiol.

Durch beide Gruppen von Wirkmechanismen kann ein östrogenes, anti-östrogenes sowie ein androgenes oder anti-androgenes Erscheinungsbild entstehen, wobei auch Mischformen zwischen den Gruppen möglich sind, deren Ausprägung unterschiedlich stark sein kann.

### ***2.2 Endpunkte sexual-endokriner Wirkung***

#### **2.2.1 Endpunkte mit Populationsrelevanz**

Bei der ökotoxikologischen Risikobewertung von Stoffen repräsentiert die Population das oberste Schutzziel. Im Mittelpunkt ökotoxikologischer Fragestellungen stehen daher die Wirkungen mit Relevanz für die Population. Entwicklungsmöglichkeiten einer Population werden vor allem durch stadienspezifische Überlebensraten und die intrinsische Reproduktionsrate von Populationen charakterisiert. Letztere wird bestimmt durch die Generationsdauer, gemessen als Entwicklungsgeschwindigkeit und Wachstum, die Anzahl reproduzierender Weibchen, gemessen als Geschlechterverhältnis, und die Anzahl von Nachkommen, gemessen als Fekundität (Eizahl) und Fertilität (Befruchtungsrate, teilweise nur erfasst in der Schlupfrate).

### 2.2.2 Indikative Endpunkte

Neben den beschriebenen populationsrelevanten Kenngrößen gibt es Endpunkte mit der Fähigkeit spezifische Wirkungen anzuzeigen und damit Hinweise auf den Wirkmechanismus zu geben.

Zu den Endpunkten mit Indikationsfunktion gehören die Biomarker, die mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden untersucht werden können. Zu ihnen gehört das Eidottervorläuferprotein Vitellogenin (VTG) sowie Sexualsteroiden wie das 17-beta-Östradiol und das 11-keto-Testosteron.

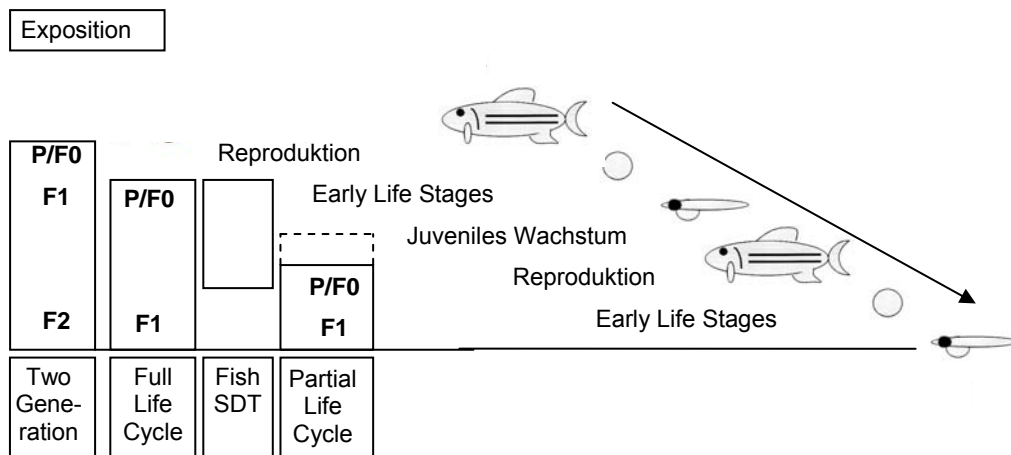
Des Weiteren gibt es morphometrische Parameter wie Längenwachstum und Gewichtszunahme. Aus ihnen lassen sich weitere Kenngrößen berechnen, Verhältniszahlen und Indizes wie etwa der Gonado-somatische Index (GSI), der Körpergewicht und Gonadengewicht in Beziehung setzt.

Die Histopathologie innerer Organe wie Gonaden und Leber können weitere wichtige Informationen liefern und zur Interpretation von Wirkzusammenhängen herangezogen werden.

Sekundäre Geschlechtsmerkmale bilden einen wichtigen Indikator, der sexual-endokrine Wirkungen anhand äußerer Merkmale anzeigen kann. Ebenso können Verhaltensmerkmale, etwa das Balz- oder Territorialverhalten, als Indikatoren dienen. Die Stärke der Ausprägung oder die Beobachtbarkeit variiert jedoch stark je nach verwendeter Fischart.

## 2.3 Methodik zur Erfassung

### 2.3.1 Testverfahren



**Abbildung 2: Übersicht über die verschiedenen Testverfahren und Generationsbezeichnungen bei chronischen Fischtests**

#### Zwei-Generationen-Test / Full Life Cycle Test

Als das ultimative Testverfahren, welches alle wichtigen populationsrelevanten Endpunkte erfasst, gilt der Full Life Cycle Test (FLCT), was auch von der Endocrine Disrupters Testing and Assessment Task Force (EDTA) so gesehen wird. Ein FLCT beinhaltet alle relevanten Lebensstadien. Im Rahmen des OECD Test Guideline Programms (OECD TGP) ist eine Validierung eines geeigneten Protokolls vorgesehen. Neben den USA und Japan hat Deutschland die Federführung dabei inne. Für Fish Life Cycle Studien liegen verschiedene Testdesigns als vorläufige Prüfprotokolle vor. Diese unterscheiden sich im Umfang der erfassten Generationen, Lebensstadien und -leistungen sowie den aufgenommenen Endpunkten. Obwohl der FLCT aufgrund

seines hohen Informationsgehaltes sich als ultimativer Test für die Endbewertung von Chemikalien anbietet, konnte er sich wegen des hohen Aufwands bislang nicht durchsetzen, da sich im Allgemeinen, d.h. bei unspezifischen Wirkmechanismen, der kürzere Early Life Stage Test als ähnlich empfindlich erwies (McKim, 1977; Mount, 1980), da er das im Allgemeinen empfindlichste Lebensstadium enthält (Umstellung der Ernährung von Dottersack- auf Fremdernährung). Für das Problemfeld spezifischer und insbesondere endokriner Wirkung von Umweltchemikalien stellt das Testverfahren jedoch die adäquate Testmethode dar, da nur in einem FLCT alle endokrin modulierten Parameter wie Generationsdauer, Sexualentwicklung und Reproduktion gleichzeitig erfasst werden. Als erweiterter FLCT kann der Zwei Generationen Test noch weitere Informationen in Hinblick auf den maternalen Transfer von Wirkungen liefern.

### **Partial Life Cycle Tests/Fish Sexual Development Test**

Bei diesen Testverfahren wird das Protokoll des FLCT auf die Prüfung bestimmter Lebensabschnitte jenseits des Early Life Stage Tests (ELS) verkürzt. Es gibt unterschiedliche Ansätze, bei denen zumeist die Reproduktionsphase im Mittelpunkt einer Studie steht.

Der Fish Sexual Development Test (FSDT), den die skandinavischen Staaten in den Arbeitsplan des OECD TGP eingebracht haben, stellt einen erweiterten ELS dar, der wie dieser den Schlupf und die frühen Lebensphasen der Fische beinhaltet. Er führt den ELS weiter bis zur Geschlechtsdifferenzierung der Fische. Dieser Lebensabschnitt gilt als sehr sensitiv für die Belastung mit sexual-endokrin wirksamen Substanzen, da in ihm auch durch vergleichsweise kurze Exposition eine nachhaltige Veränderung von Populationsstrukturen ausgelöst werden kann.

### **Fish Screening Assay**

Zur Feststellung des sexual-endokrinen Wirkpotenzials chemischer Substanzen auf aquatische Vertebraten wird zurzeit ein 21d Fish Screening Assay (FSA) validiert, der voraussichtlich als Vorschlag für eine OECD Test Guideline (TG) ins internationale Abstimmungsverfahren gehen wird. Die Zielsetzung dieses Testes ist die sichere Identifizierung einer sexual-endokrinen Wirkung *in vivo* anhand von

indikativen Endpunkten (z. B. VTG), die nachfolgend mit Daten aus höherstufigen Tests bewertet werden sollen. Am Fraunhofer IME wurden zahlreiche FSA durchgeführt, die die genannten Wirkmechanismen berücksichtigten. Da einige Tests vor der Einigung auf ein Testprotokoll für die Validierung als OECD-Verfahren stattfanden, betrug die Versuchsdauer teilweise nur 14 Tage. Das Testdesign (Zahl der Tiere, Beckengröße, Laichschalen) und der Endpunkt VTG-Konzentration im Blut waren identisch mit dem FSA. Zusätzlich wurden zumeist, wie auch bei der Durchführung von FSAs im Rahmen der Validierung des OECD-Verfahrens, Eizahlen und Befruchtungsraten ermittelt, sowie die Konzentration des aktiven männlichen Sexualhormons 11-keto-Testosteron im Blut untersucht. Die genannten 14- und 21-Tage Tests werden im Folgenden als Kurzzeit-Tests zusammengefasst.

### 2.3.2 Verwendete Fischarten

Da die Durchführung von FLC Studien sehr kosten- und zeitaufwändig ist, müssen sich praktikable Testarten durch einfache Hälterungsbedingungen und kurze Generationsdauer auszeichnen. Zudem sollten ausreichende Kenntnisse über ihre Biologie und Erfahrung im Umgang mit der Testspezies vorhanden sein.

Zurzeit werden die drei Fischarten Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*), Zebra-bärbling (*Danio rerio*) und der Japanische Reiskärpfling (Medaka, *Oryzias latipes*) am häufigsten eingesetzt. Jede dieser Fischarten hat bezogen auf Hälterung, Generationsdauer und Handhabung im FLCT ihre Vor- und Nachteile und unterliegt zudem nationalen und internationalen Vorlieben. Die OECD ist bestrebt, Testprotokolle zu erarbeiten und zu validieren, die für alle genannten Fischarten anwendbar sind.

Neben den genannten Arten werden noch FLC Studien mit der Schafskopfelritze (*Cyprinodon variegatus*), einem Brackwasserfisch für die marine Riskobewertung in den USA, durchgeführt. Außerdem wird versucht, die OECD-Testprotokolle auch auf den Stichling (*Gasterosteus aculeatus*) auszuweiten.

**Tabelle 1: Übersicht der Fischarten zur Verwendung in Fischtests nach OECD**

Fischart	Familie	Zeit bis zum Schlupf	Zeit bis zur Geschlechtsreife	Eizahl / (Weibchen * Ereignis)	Eizahl / (Weibchen * Monat)	Territorialität
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Cyprinodontidae	5-6 d	60 d	15-30	400-800	(Ja)
<i>Danio rerio</i>	Cyprinidae	3 d	60-90 d	20-80	500-1200	Nein
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gasterosteidae	7-12 d	1 Jahr	100-400	100-400	Ja
<i>Oryzias latipes</i>	Adrianichthyidae	10 d	60-90 d	10-30	100-250	Nein
<i>Pimephales promelas</i>	Cyprinidae	3-5 d	120 d	50-250	400-1200	Ja
Informationen aus eigener Erfahrung, sowie aus „Revised draft detailed review paper on fish screening assays for endocrine disruption“ Batelle, EPA contract No. 68-W-01-023						

## 2.4 Verwendetes Datenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurde Datenmaterial aus unterschiedlichen Quellen verwendet. Es lagen umfangreiche Daten aus FLCT und Zwei-Generationen-Tests des Fraunhofer IME vor. Die Datenbasis wurde durch Recherche in Literaturdatenbanken erweitert.

Schließlich stellte das Umweltbundesamt weitere vertrauliche Studiendaten aus der regulatorischen Stoffbewertung zur Verfügung.

### 2.4.1 Daten aus Studien am Fraunhofer IME

In den letzten Jahren wurden am Fraunhofer IME zehn Zwei-Generationen-Studien und FLCT unter der Berücksichtigung der verschiedenen sexual-endokrinen Wirkmechanismen durchgeführt, sowie für drei weitere, von Kooperationspartnern durchgeführte Studien VTG-Messungen vorgenommen. Zu allen genannten Wirkmechanismen liegen zudem Daten aus FSA vor. Alle Studien (auch die der Kooperationspartner) wurden mit Zebrabärblingen aus der eigenen Zucht durchgeführt. Eine Auflistung der Studien zeigt Tabelle 2.

**Tabelle 2: Übersicht der durchgeführten Studien am Fraunhofer IME unter Berücksichtigung der verschiedenen Wirkmechanismen**

<b>Wirkmechanismus</b>		<b>Durchgeführte Studien</b>
<b>Rezeptor- Interaktionen</b>	Östrogen-Rezeptor-Agonist	1 Zwei-Generationen-Test 4 FLCT 4 Kurzeittests
	Östrogen-Rezeptor-Antagonist	1 Zwei-Generationen-Test 1 Kurzeittest
	Androgen-Rezeptor-Agonist	1 Zwei-Generationen-Test 1 Kurzeittest
	Androgen-Rezeptor-Antagonist	1 Zwei-Generationen-Test 1 Kurzeittest
<b>Enzym- Interaktionen</b>	Aromatase-Inhibitoren	2 Kurzeittests; FLCT (Auftragsstudien)
	Inhibitoren der Testosteron-Synthese	1 FLCT 2 Kurzeittests

## 2.4.2 Daten aus Literatur

Um weitere Informationen insbesondere zu anderen Fischarten zu gewinnen, wurde eine Auswertung von Literaturdaten vorgenommen. Die Zahl der verwendeten Studien für die einzelnen Wirkmechanismen fasst Tabelle 3 zusammen. In der Literaturrecherche wurden nur Studien mit den drei eingangs vorgestellten Fischarten berücksichtigt. Auf die Studien wird im Folgenden einzeln eingegangen.

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten FLCT und weiterer Studien aus der Literatur**

<b>Wirkmechanismus</b>		<b>Vorliegende Studien</b>
<b>Rezeptor- Interaktionen</b>	Östrogen-Rezeptor Agonist	5 FLCT 3 Partial LCT, FSDT
	Östrogen-Rezeptor Antagonist	1 FLCT 2 Partial LCT
	Androgen-Rezeptor Agonist	1 FLCT 1 FSDT
	Androgen-Rezeptor Antagonist	Keine Daten vorhanden
<b>Enzym- Interaktionen</b>	Aromatase-Inhibitoren	1 FSDT
	Inhibitoren der basalen Steroid-Synthese	Keine Daten vorhanden



### 2.4.3 Datenmaterial Umweltbundesamt

Der Datenbestand des Umweltbundesamtes enthält Daten aus weiteren Full Life Cycle Studien. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Studien auf Merkmale, die Hinweise auf sexual-endokrine Wirkungen zeigten, untersucht. Da unterschiedliche Studien-Designs mit Langzeit-Belastung und einer Fülle von Wirkmustern vorlagen, war eine Vorauswahl erforderlich. Ausgewählt wurden zunächst Studien, deren Expositionsdauer mehr als 100 Tage umfasste. Hinsichtlich des Wirkmechanismus wurden solche Studien ausgeklammert, bei denen die getesteten Substanzen durch einen klar akuten Wirkmechanismus charakterisiert waren, insbesondere Interaktionen mit Nervenmembranen (AChE-Inhibitoren, Pyrethroide).

Die größte Gruppe der verbleibenden Stoffe waren die DMI-Fungizide, mit insgesamt neun FFLC und Zwei-Generationen-Tests für sieben Substanzen. Neben diesen Studien wurden letztendlich noch 16 weitere chronische Fischstudien (FLCT, ELS, JG, etc. – alle nicht spezifisch für endokrine Wirkungen) herangezogen.

## 3 Ergebnisse

Im folgenden Teil wird zunächst die Auswertung der Studiendaten des Fraunhofer IME mit einer Ergänzung aus den Literaturdaten dargestellt. Es werden die Empfindlichkeiten von populationsrelevanten und indikativen Endpunkten gegenübergestellt. Für die Wirkmechanismen mit guter Datenlage (Östrogenrezeptor-Agonisten und Aromatase-Hemmer) werden Ergebnisse aus Standardtest zum Vergleich der Sensitivitäten herangezogen. Der erste Teil der Ergebnisse wird abgeschlossen mit einer Einordnung der Studien-Daten des Umweltbundesamtes.

Es folgt eine Einordnung der Ergebnisse der FSA Studien am FH-IME im Hinblick auf die Vorhersagefähigkeit von indikativen Endpunkten bezüglich populationsrelevanter Effekte.

Abschließend wird aus der vorliegenden Datenlage ein Vorschlag für eine gestufte Teststrategie abgeleitet, die der Aufklärung und Quantifizierung des Effektpotenzials von Chemikalien dient, für die ein Anfangsverdacht auf sexual-endokrine Wirkungen bei Fischen besteht. Dieser Anfangsverdacht kann beispielsweise aufgrund von

Strukturbetrachtungen, toxikologischen Informationen oder empirischen Befunden erhoben werden. Die Auswahlstrategie und Testmethodik für die Abklärung des Anfangsverdachts („Eingangsstufe“ in die Teststrategie für endokrin wirksame Substanzen) war nicht Gegenstand dieses Vorhabens.

### **3.1 Endpunktvergleich aus Full Life Cycle und Zwei-Generationen-Tests**

Untersuchungsgegenstand war die Empfindlichkeit der untersuchten Endpunkte sexual-endokriner Wirkungen. Neben der Empfindlichkeit der populationsrelevanten wurde insbesondere die der indikativen Endpunkte herausgearbeitet. Weitergehend wurde die Sensitivität der untersuchten Lebensstadien analysiert. Ziel war die Anordnung der empfindlichsten Endpunkte in Relation zu den untersuchten sexual-endokrinen Wirkmechanismen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Recherche in Anlehnung an die Gruppeneinteilung der Wirkmechanismen dargestellt.

Die im Zwei-Generationen-Test bzw. FLCT erfassten Generationen werden wie folgt bezeichnet (siehe Abbildung 2):

- Parental-Generation: F0 oder P
- erste Filial-Generation: F1
- zweite Filial-Generation: F2.

Daraus ergibt sich, dass die F0 im Zwei-Generationen-Test erst mit dem Beginn der Reproduktion belastet wird, während die Belastung der F0 im FLCT mit den befruchteten Eiern beginnt. Eine F2 gibt es somit im FLCT nicht.

### 3.1.1 Östrogen Rezeptor Agonist/Antagonisten

Die ersten beschriebenen sexual-endokrinen Wirkungen von Umweltchemikalien auf Fische wurden auf Östrogen-Rezeptor-Agonisten zurückgeführt. Da die aufkommenden Forschungsprojekte zum Thema endokrine Wirkungen im Wesentlichen auf die östrogen wirksamen Substanzen fokussiert waren, liegen zu diesen die umfangreichsten Datenmengen vor.

Diese Wirkklasse umfasst die Substanzen, die durch ihre chemische Struktur in der Lage sind mit dem Östrogenrezeptor zu interagieren. Rezeptoragonisten können dabei ihre in der Regel geringere Affinität zum Zielrezeptor im Vergleich zu den natürlich vorkommenden Hormonen durch hohe Konzentrationen ausgleichen. Daher werden Liganden starker und schwacher östrogenen Potenz unterschieden.

Am Fraunhofer IME wurden Full Life Cycle Tests und Zwei-Generationen-Tests mit starken und schwachen Östrogenen am Zebraquarienfisch durchgeführt. Die untersuchten Substanzen waren (mit abnehmendem östrogenem Potential in Rezeptortests) Ethinylöstradiol (EE2), als ein wichtiges kontrazeptives Östrogen, p-tert Octylphenol als Vertreter der Alkylphenole, Genistein als Phytohormon mit östrogenem Potenzial sowie Bisphenol A als wichtige Industriechemikalie.

Die nominalen Testkonzentrationen

- Ethinylöstradiol (EE2): 0.05, 0.3, 1.67, 3.0, 10 ng/L
- p-tert Oktylphenol (OP): 1.2, 3.2, 12, 38 µg/L
- Genistein (GEN): 0.48, 1.5, 4.9, 16 µg/L
- Bisphenol A (BPA): 94, 188, 375, 750, 1500 µg/L

wurden wie folgt analytisch bestätigt:

- Ethinylöstradiol (EE2), Durchfluss, mittlere gemessene Konzentration: 0.06, 0.3, 1.1, 3.0, 10 ng/L
- p-tert Oktylphenol (OP), Durchfluss, mittlere gemessene Konzentration: 1.0, 2.8, 11, 35 µg/L

- Genistein (GEN), semistatisch, Wasserwechsel 3 x wöchentlich, mittlere gemessene Konzentration: 0.45, 1.3, 4.2, 20 µg/L
- Bisphenol A (BPA), semistatisch, Wasserwechsel 3 x wöchentlich, mittlere initial gemessene Konzentration: Bestätigung der Nominalkonzentrationen; mittlere gemessene Konzentration (geometrisches Mittel zwischen initial und aged): 12, 24, 40, 86, 157 µg/L.

In den genannten Studien erwies sich die Befruchtungsrate als empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt (NOEC: EE2 0.3 ng/L<sup>1</sup>; OP 11 µg/L<sup>2</sup>; GEN 1.3 µg/L<sup>3</sup>; BPA<sub>initial</sub><sup>4</sup> 750 µg/L, 86 µg/L bezogen auf mittlere gemessene Konzentrationen). Die Befruchtungsrate nahm bei allen vier Substanzen von 85-95 % innerhalb eines kleinen Konzentrationsintervalls (Faktor 2-3) auf Werte deutlich unter 50 % ab. (Lediglich bei Genistein war die Abnahme nicht so weit zu verfolgen, da die entsprechende Konzentrationsstufe aufgrund eines anderen Wirkmechanismus (Hemmung der Proteinkinasen) Effekte auf die Überlebensrate der frühen Lebensstadien hervorrief.) Diese Abnahme der Befruchtungsrate war neben einer steilen Konzentrations-Wirkungsbeziehung auch durch eine hohe statistische Schärfe gekennzeichnet, da die Befruchtungsrate der Kontrollgruppen einen Varianzkoeffizienten von nur etwa 5% aufwies. Als weiterer ähnlich empfindlicher Endpunkt erwies sich der Zeitpunkt der ersten Eiablage.

Weitere Endpunkte, die beim Zebrafisch empfindlich reagierten, waren das juvenile Wachstum und die Eiproduktion. In der Studie mit Ethinylöstradiol wurde in der höchsten Konzentration beobachtet, dass die männlichen Fische nicht zu balzen begannen, da sie in ihrer Geschlechtsentwicklung „arrestiert“ waren (Schaefers et al., 2007; Segner et al., 2003). Nach Beendigung der Exposition entwickelten sie sich innerhalb von zwei bis drei Monaten zu Männchen mit normalem Aussehen und Balzverhalten; die Befruchtungsrate betrug aber lediglich 4 %. Offenbar war während

---

<sup>1</sup> EC50: 1,1 ng/L; EC10: 0,6 ng/L. Wegen des Abstands zwischen den Testkonzentrationen und der Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ist die EC10 der NOEC vorzuziehen

<sup>2</sup> EC50: 28 µg/L; EC10: 13,5 µg/L, was die NOEC bestätigt

<sup>3</sup> Wegen hoher ELS-Sterblichkeit in den höheren Konzentrationen kein ECx bestimmbar

<sup>4</sup> EC10: 390 µg/L initial, 45 µg/L geometrisch gemittelt. Bei zwei Replikaten ist die EC10 verlässlicher

der Exposition während der Sexualentwicklung ein irreversibler Schaden gesetzt worden.

In den Life Cycle Tests mit dem starken Östrogen Ethinylöstradiol und dem schwachen Östrogen Bisphenol A wurde auch die VTG-Induktion in männlichen Zebra-  
bärblingen durch Messungen von Blutplasmaproben bestimmt. In beiden Fällen war dieser Endpunkt ebenso empfindlich wie der empfindlichste populationsrelevante Endpunkt Befruchtungsrate.

### **Studien aus der Literatur**

In einem Full Life Cycle Test mit Bisphenol A von (Sohoni et al., 2001)) mit Dickkopf-  
elritze (Nominalkonzentrationen: 1, 16, 160, 640, 1280 µg/L) erwies sich die Schlupf-  
rate als empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt (NOEC: 160 µg/L).

Die histopathologische Untersuchung der Tiere zeigte Veränderung der Testis  
bereits bei 16 µg/L (NOEC: 1 µg/L). Dieser Endpunkt erwies sich demnach sensitiver  
als der empfindlichste populationsrelevante Endpunkt und die anderen indikativen  
Parameter. Die Männchen zeigten eine erhöhte VTG-Konzentration im Blut bei 160  
µg/L (NOEC: 16 µg/L) und eine Erhöhung des GSI bei 640 µg/L (NOEC: 160 µg/L).

In einer Studie von Länge et al. (2000) mit Dickkopf-  
elritzen wurde Ethinylöstradiol getestet in den Nominalkonzentrationen 0.2, 1.0, 4.0, 16 und 64 ng/L. Am empfind-  
lichsten reagierten die Endpunkte Geschlechterverhältnis und das Wachstum der F0-  
Generation sowie das juvenile Wachstum der F1-Generation (NOEC: je 1 ng/L). Die  
Gonadenhistologie zeigte die gleiche Empfindlichkeit. Untersuchter Parameter war  
das Auftreten von Ovotestis-Strukturen.

In den Studien von Sohoni et al. und Länge et al. wurde der Endpunkt Befruchtungs-  
rate, der sich in den Zebra-  
bärbling-Studien als sehr empfindlich erwies, nicht unter-  
sucht, sondern war in der Schlupfrate der F1-Generation enthalten.

In einer weiteren Studie mit Dickkopf-  
elritzen von (Parrott and Blunt, 2005) mit  
Ethinylöstradiol (0.32, 1.2, 3.5, 9.6, 23 ng/L) bildete die Befruchtungsrate den  
Endpunkt mit der größten Sensitivität (NOEC: < 0.32 ng/L).

Seki et al. (2005) führten eine Full Life Cycle Studie mit 17-beta-Östradiol unter Verwendung des japanischen Reiskärpflings durch (Nominalkonzentrationen: 0.95, 3.05, 9.77, 31.3, 100 ng/L; gemessen im Mittel: 0.94, 2.86, 8.66, 27.9, 92.4 ng/L). Die empfindlichsten populationsrelevanten Parameter waren Befruchtungsrate der F0-Generation und das Wachstum der juvenilen Phase der F1-Generation (NOEC: je 2.86 ng/L). Die VTG-Induktion beim Männchen erwies sich als gleich empfindlich (NOEC: 2.86 ng/L).

Das Alkylphenol Nonylphenol bewirkte im FLCT mit Medaka (Yokota et al., 2001) (Nominalkonzentrationen: 1.85, 5.56, 16.7, 50, 150 µg/L; gemessen im Mittel: 4.2, 8.2, 17.7, 51.5, 183 µg/L) eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses der F1-Generation in Richtung der weiblichen Tiere (NOEC: 8.2 µg/L). Bereits die Überlebensrate (Zeitraum Tag 20-Tag 60 nach Schlupf) der Parental-Generation (F0) reagierte empfindlich (NOEC: 8.2 µg/L). Bei den indikativen Endpunkten zeigte der gonado-somatische Index bei den Weibchen der F0-Generation höhere Empfindlichkeit als die genannten populationsrelevanten Endpunkte (NOEC: 4.2 µg/L).

In einer weiteren Studie von Seki et al. (2003) mit dem Alkylphenol 4-tert Pentyphenol (Nominalkonzentration: 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/L; gemessen im Mittel: 51.1, 100, 224, 402, 931 µg/L) wurde bei Medaka die höchste Empfindlichkeit beim Geschlechterverhältnis und der Befruchtungsrate der Parental-Generation (F0) sowie Längenwachstum der F1-Generation beobachtet (NOEC: 100 µg/L). Der indikative Endpunkt VTG-Induktion beim Männchen der F0-Generation zeigte eine höhere Empfindlichkeit (NOEC <51.1 µg/L).

### **Vergleich mit Ergebnissen aus Standardtests**

Da es sich bei den untersuchten Substanzen um Industriechemikalien und Arzneimittel handelt, die ganz überwiegend im Rahmen von Forschungsprojekten untersucht wurden, gibt es kaum regulatorische und qualitätsgesicherte Standardtest, die zum Vergleich herangezogen werden können, Allerdings können aus den zugänglichen Datensätzen Ergebnisse gewonnen werden, die denen von Standardtestverfahren entsprechen. Dazu müssen die Erhebung der Endpunkte und das Expositionsfenster übereinstimmen. So kann die Anfangsphase der F0-Generation

aus einem mit befruchteten Eiern beginnenden FLCT 1:1 mit einem Early Life Stage Test verglichen werden. Demgegenüber ist ein Juveniler Wachstumstest nicht mit einer FLCT-Phase gleichzusetzen, da die Fische im FLCT schon seit der Eiphasse exponiert waren und sich deshalb möglicherweise Wirkungen manifestieren, die schon vor Beginn der juvenilen Wachstumsphase angelegt wurden.

Für die frühen Lebensstadien (F0-Generation) aus den eigenen FLCTs mit dem Zebraquarienfisch konnten bei EE2, BPA und Octylphenol keine Effekte auf die Schlupf- und Überlebensrate oder auf das Wachstum detektiert werden. Die letalen Effekte von Genistein in den hohen Testkonzentrationen sind auf einen anderen beschriebenen Wirkmechanismus zurückzuführen (Hemmung der Proteinkinasen führte zum Tod der Embryonen bei Beginn der Spontanbewegungen im Ei und beim Schlupf). In drei der vier Studien war demgegenüber das Wachstum der juvenilen Tiere signifikant reduziert. Dieser Endpunkt zeigte die gleiche Empfindlichkeit wie die Befruchtungsraten, wird aber nur im FSDT nach vergleichbarer Exposition bestimmt.

In der EE2-Studie von Länge et al. mit der Dickkopfelritze wurde eine signifikante Reduktion des Längenwachstums der 28 Tage alten Tiere der F0-Generation festgestellt. Aber auch in dieser Art stellt das juvenile Wachstum (neben der Verschiebung des Geschlechterverhältnisses) den empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt dar.

In den Medaka-FLCT wurden die ELS-Phasen in Bezug auf den Parameter Wachstum nicht explizit ausgewertet. Die Schlupfraten zeigten nach Belastung mit 17 beta-Östradiol und Pentylphenol keine Veränderung zu den Kontrollgruppen. Lediglich Nonylphenol reduzierte die Schlupf- und Überlebensrate signifikant (NOEC: je 51.5 µg/L). Dieser Endpunkt war im FLCT unempfindlicher als die empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkte.

### **Vergleich der Fischarten bezüglich ÖR-Agonisten**

Im Vergleich von Testergebnissen mit verschiedenen Fischarten zeigte sich, dass bei dem starken Östrogen Ethinylöstradiol sehr ähnliche Schwellenkonzentrationen von Wirkungen erzielt wurden (Tabelle 4). Dies gilt für den Biomarker VTG-Induktion in Männchen ebenso wie für die populationsrelevanten Endpunkte Befruchtungsraten

und Geschlechterverhältnis. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in Fischarten verschiedener Familien (Salmonidae, Cyprinidae, Oryziatidae) die Aufnahme- und Verteilungsprozesse zu ähnlichen Konzentrationsverhältnissen am primären Wirkort, dem Östrogenrezeptor, führen. Die Ausprägung der Folgewirkungen auf populationsrelevante Endpunkte mag dann unterschiedlich sein, ist aber nicht in allen Fischarten vergleichbar untersucht worden.

**Tabelle 4 Wirkungen des starken Östrogens Ethinylöstradiol bei verschiedenen Testspezies**

Endpunkt	Fischart	LOEC	NOEC	EC50	EC10
VTG in Männchen (Wirkindikator, Kurzzeittests)	Zebrabärbling	1 ng/L			
	Dickkopfritze <sup>b)</sup>	1 ng/L			
	Regenbogenforelle <sup>c)</sup>	0.3 -1 ng/L			
Befruchtungsrate (Life Cycle Test)	Zebrabärbling <sup>a)</sup>			1 ng/L	0.6 ng/L
	Dickkopfritze <sup>d)</sup>			1 ng/L	0.3 ng/L
Geschlechterverhältnis (Life Cycle Test)	Dickkopfritze <sup>e)</sup>	4 ng/L	1 ng/L		
	Medaka <sup>f)</sup>	10 ng/L	1 ng/L		

a) Wenzel und Schäfers 2001, b) Pawlowski et al. 2004, c) (Sheahan et al., 1994), d) Parrott et al. 2005, e) Länge et al. 2001, f) (Scholz and Gutzeit, 2000)

Die Reduktion der Befruchtungsrate als statistisch scharfer und besonders populationsrelevanter Endpunkt (Young et al. 2002) wurde in allen verwendeten Fischarten direkt oder indirekt (über die Schlupfrate der F1-Generation) nachgewiesen und zeigte mit einer Ausnahme<sup>5</sup> unter den untersuchten populationsrelevanten Endpunkten die größte Empfindlichkeit.

Bei Dickkopfritze und Medaka zeigte zudem der Endpunkt Geschlechterverhältnis eine hohe Sensitivität. Beim Zebrabärbling führten die östrogen wirksamen Substan-

---

<sup>5</sup> Yokota et al., 2001, Nonylphenol und Medaka: Geschlechterverhältnis und die Überlebensrate der juvenilen Entwicklungsphase



zen zu einer Verzögerung des Zeitpunktes der ersten Eiablage. Dieser Endpunkt ist nicht in allen Tests beschrieben und deshalb für Medaka und Dickkopfelritze weniger gut belegt. Bei allen drei Fischarten wurde eine Verzögerung des Wachstums der juvenilen Tiere beobachtet. Die populationsrelevanten Endpunkte Befruchtungsrate und Geschlechterverhältnis/Entwicklungsdauer, sowie das daran gekoppelte Wachstum liegen eng beieinander; die NOECs unterscheiden sich höchstens um eine Konzentrationsstufe. Das Expositionsfenster eines Early Life Stage Tests war bei den untersuchten Fischarten nicht in der Lage, das Wachstum ähnlich empfindlich zu beeinträchtigen, wie es etwa bei der Exposition einschließlich der Juvenil- (und Sexual-) Entwicklung ist. Der Unterschied bei der NOEC kann bei den kleinen Fischarten Medaka und Zebra-Ärbling mehr als eine Größenordnung betragen. Bei größeren Fischen, z.B. der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* erfasst die Testdauer im ELS ein absolut deutlich größeres Wachstum; damit könnte der Endpunkt im Nachweis von Wirkungen empfindlicher reagieren.

Der Wirkindikator VTG-Induktion zeigte insbesondere bei Zebra-Ärbling und Medaka die gleiche Empfindlichkeit wie die empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkte. Bei der Dickkopfelritze erwiesen sich histopathologische Befunde der Gonaden als besonders sensitiv.

Somit ist ein Early Life Stage Test mit Östrogenrezeptor-Agonisten deutlich unempfindlicher als ein FLCT, während ein FSDT vergleichbare Empfindlichkeit aufweisen müsste, auch wenn der empfindlichste und schärfste populationsrelevante Endpunkt (Befruchtungsrate) nicht abgebildet ist.

### **Zusammenfassung ÖR-Agonisten**

Für den Wirkmechanismus ÖR-Agonist zeigte sich, dass in allen Fischarten die Befruchtungsrate den relevanten und empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt stellt. Für Medaka und Dickkopfelritze ist das Geschlechterverhältnis, für den Zebra-Ärbling die Entwicklungszeit im männlichen Geschlecht ebenso empfindlich oder nur leicht unempfindlicher. Ähnliches gilt für das juvenile Wachstum und den Zeitpunkt der ersten Eiablage.

Der indikative Endpunkt VTG zeigt korrespondierende Empfindlichkeiten, wobei VTG in beiden Geschlechtern zunimmt. Damit geben sowohl der populationsrelevante

Endpunkt Befruchtungsrate als auch der indikative Endpunkt VTG-Induktion einen Hinweis auf den Wirkmechanismus.

### 3.1.2 Östrogenrezeptor-Antagonist

Am Fraunhofer IME wurde in einem Zwei-Generationen-Test mit dem Zebraabärbling Tamoxifen-Citrat als Testsubstanz eingesetzt in den Nominalkonzentrationen 0.16, 0.5, 1.6, 5.0 und 16 µg/L. Tamoxifen ist ein Anti-Östrogen, das in der endokrinen Therapie von Brustkrebs eingesetzt wird. Die Befruchtungsrate erwies sich als der sensitivste Endpunkt mit Populationsrelevanz. Die NOEC lag bei 1.6 µg/L und damit unter dem Wert von Eiproduktion und Überlebensrate der F1-Generation (NOEC je 5.0 µg/L). Die Reduktion der VTG-Konzentration in Weibchen der F0-Generation erwies sich als gleich empfindlich wie die Befruchtungsrate (NOEC, 1.6 µg/L). Neben dem Eidottervorläuferprotein wurde das Sexualsteroid 11-keto-Testosteron im Blutplasma gemessen. Mit einer signifikanten Abnahme bei 13.5 µg/L war dieser Endpunkt um eine Konzentrationsstufe unempfindlicher als die VTG-Konzentration.

In einem Partial Life Cycle Test mit Tamoxifen (nominal: 3.2; 10; 32; 100; 320 µg/L) beobachteten van der Veen et al. (2007) bei Zebraabärblingen die Schlupfrate und das Wachstum der F1- Generation als empfindlichste Endpunkte mit Populationsrelevanz (NOEC: <32 µg/L). Die histologische Untersuchung der Gonaden zeigte eine Zunahme der Leydig- Zellzahl. Dieser Endpunkt war um einen Faktor unempfindlicher als die oben genannten Endpunkte (NOEC: 32 µg/L).

In einer Partial Life Cycle Studie mit Tamoxifen Citrat (nominal: 0.18, 0.56, 1.8, 5.6, 18 µg/L; gemessen im Mittel: 0.11, 0.41, 1.65, 5.97, 18.2 µg/L) sowie einem FLCT (nominal: 0.01, 0.08, 0.64, 5.12 µg/L; gemessen: 0.01, 0.07, 0.61, 4.08 µg/L) von Williams et al. (2007) erwiesen sich Dickkopfelnritzen am empfindlichsten in der juvenilen Wachstumsphase der F1-Generation im PLC (NOEC: 1.65 µg/L). Die VTG-Reduktion war um zwei Konzentrationsstufen empfindlicher (NOEC: 0.11 µg/L). In beiden Studien wurden Befruchtungsrate und Geschlechterverhältnis nicht untersucht.

## Zusammenfassung ÖR-Antagonisten

Für den Wirkmechanismus Östrogenrezeptor-Antagonist lag Datenmaterial aus einem Zwei Generationen Test, einem FLCT und zwei PLC-Studien zur Bewertung der Endpunkte vor, das ausschließlich mit Tamoxifen und Tamoxifen-Citrat gewonnen wurde. Für den japanischen Reiskarpfing war keine Studie vorhanden. Da alle Studien unterschiedliche Endpunktmuster untersuchten, ist es schwierig, ein einheitliches Bild zu erhalten. Bei den indikativen Endpunkten zeigte VTG die höchste Empfindlichkeit, bei den populationsrelevanten Endpunkten war die Befruchtungsrate am empfindlichsten (entsprach VTG), wenn sie gemessen wurde. Das juvenile Wachstum reagierte um zwei Konzentrationsstufen unempfindlicher als VTG.

### 3.1.3 Androgenrezeptor-Agonisten

Als repräsentativer Stoff für den Wirkmechanismus Androgen-Rezeptor-Agonist wurde Trenbolon eingesetzt, ein anaboles Steroid, das vor allem in den USA zur Steigerung der Mastleistung von Färsen und Ochsen eingesetzt wird. Die Substanz wurde in einem Zwei-Generationen-Test mit dem Zebrabärbling in den Nominal-Konzentrationen 1; 3; 10; 30; 90 ng/L getestet (Boettcher et al., 2007). Bei einer Konzentration von 3 ng/L wurde eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in Richtung der Männchen beobachtet (NOEC: 1ng/L). Bei 30 ng /L Trenbolon hatten sich alle Tiere der F1 zu Männchen entwickelt. Bei den indikativen Endpunkten reagierte VTG in beiden Geschlechtern nicht in dem getesteten Konzentrationsbereich. Eine histopathologische Analyse von Eireife-Stadien zeigte eine Debris der Eizellen bereits bei 1 ng/L an. Eine NOEC konnte für diesen Endpunkt nicht bestimmt werden (NOEC: <1 ng/L).

In einem Fish Screening Assay, der am Fraunhofer IME durchgeführt wurde, wurde VTG bei weiblichen Zebrabärblingen erst ab einer Konzentration von nominal 270 ng/L signifikant reduziert.

Ein Fish Sexual Development Test mit Trenbolon (nominal: 5, 50, 500, 5000 ng/L;

gemessen im Mittel: <5, 9.7, 23, 193, 2779 ng/L) von Holbech et al. (2007) zeigte ebenfalls eine Verschiebung der Geschlechter hin zu einer kompletten Männchengruppe (NOEC: <5 ng/L).

Auch hier wurde eine deutliche Unempfindlichkeit der VTG-Antwort festgestellt. Das Protein wurde erst bei einer Konzentration von Trenbolon von 193 ng/l signifikant reduziert. Offenbar interagiert die Aktivierung des Androgenrezeptors im physiologischen Konzentrationsbereich nicht signifikant mit der Bildung von 17-beta Östradiol. Bei hohen Trenbolon-Konzentrationen kann eine negative Rückkopplung mit der Steroid-Synthese zum Testosteron angenommen werden, wodurch sich auch die 17-beta-Östradiol- und damit die VTG-Konzentration vermindert.

Für Methyltestosteron, ein weiteres Androgen, konnte in einem Full Life Cycle Test (Nominal Konzentrationen: 0.31, 0.98, 3.13, 10, 32 ng/L; gemessen im Mittel: 0.35, 1.09, 3.29, 9.98, 27.75 ng/L) mit Medaka (Seki et al., 2004) ebenfalls eine komplette Vermännlichung der belasteten Fischgruppen beobachtet werden (NOEC: 9.98 ng/L). VTG wurde bei den Männchen der nächst niedrigeren Konzentrationsstufe induziert (NOEC: 3.29 ng/L), bei den Weibchen in allen Konzentrationen reduziert und war damit empfindlicher als der populationsrelevante Endpunkt. Das widersprüchliche Ergebnisbild (Induktion von VTG in Männchen) kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass das Geschlechterverhältnis aufgrund äußerlicher Geschlechtsmerkmale bestimmt wurde. Bei 9.98 ng/L war zwar keine statistisch signifikante Verschiebung mehr zu beobachten. Allerdings wiesen einige Tiere mit männlichen Geschlechtsmerkmalen Ovarien auf. So kann vermutet werden, dass es sich bei diesen Tieren um Weibchen handelte, die unvollständige Umwandlungen zum männlichen Geschlecht zeigten, als Männchen eingeordnet wurden, aber im Vergleich zu Kontrollmännchen höhere VTG-Gehalte aufwiesen. Das Beispiel macht deutlich, dass Kriterien für die Klassifizierung von Geschlechtern und damit Geschlechterverhältnissen festgelegt werden müssen. Dass Methyltestosteron, eine aktive Form des Testosteron in Säugern, auf Fische in hohen Konzentrationen oder nach langer Exposition auch verweiblichend wirken kann (Fenske und Segner 2004) und damit noch andere sexual-endokrine Wirkmechanismen bedient, macht die Interpretation nicht einfacher.

## **Zusammenfassung AR-Agonisten**

Für den Wirkmechanismus AR-Agonist zeigte sich, dass das Geschlechterverhältnis den relevanten und empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt stellt.

Herauszustellen ist, dass anders als bei den anderen beschriebenen Mechanismen, wo die molekularen Biomarker korrespondierende Empfindlichkeiten zeigten, dies für die AR-Agonisten nicht durchgängig bestätigt werden kann. Die Empfindlichkeiten zwischen den untersuchten populationsrelevanten und indikativen Parametern liegen bis zu zwei Größenordnungen auseinander. Somit sind sowohl das im FSA untersuchte VTG als auch das im IME zusätzlich einbezogene 11-keto-Testosteron als Biomarker ungeeignet, um eine Wirkung im Bereich populationsrelevanter Effektkonzentrationen sicher festzustellen. Bei einem zu engen Bereich niedriger Testkonzentrationen droht also ein falsch negatives Ergebnis, was die Nutzung von Ergebnissen aus FSAs als Trigger für eine weitere Teststufe bei diesem Wirkmechanismus in Frage stellt. Daher besteht Bedarf für die Identifikation eines AR-spezifischen Biomarkers, der vergleichbar aussagekräftig ist wie VTG für ER-Interaktionen.

Für Medaka erwiesen sich im vorliegenden Beispiel sekundäre Geschlechtsmerkmale im Life Cycle Test als etwas (aber nicht statistisch signifikant) empfindlicher als das Geschlechterverhältnis; allerdings war VTG hier sogar noch empfindlicher. Die ebenfalls über klare sekundäre Geschlechtsmerkmale verfügende Dickkopfelnitze könnte aufgrund der Unterdrückung männlicher Geschlechtsmerkmale schwacher Männchen durch wenige dominante Männchen Schwierigkeiten bereiten.

Ob die unterschiedliche relative Empfindlichkeit der weiblichen VTG-Antwort in den vorliegenden Studien in der Unterschiedlichkeit der Substanz oder der Fischart begründet ist, kann aufgrund der dürftigen Datenlage zu diesem Mechanismus nicht geklärt werden.

### **3.1.4 Androgenrezeptor-Antagonisten**

Für die Androgenrezeptor-Antagonisten repräsentierte Flutamid die Kandidatensubstanz in einem Zwei Generationen Test am Fraunhofer IME. Diese Substanz wird in der Therapie von Prostata-Karzinomen eingesetzt. Die Substanz wurde in den

Nominalkonzentrationen 35.7, 82.2, 189, 435 und 1000 µg/L am Zebraabärbling getestet.

Insbesondere die Eiproduktion der parental (F0)-Generation reagierte empfindlich (NOEC: 189 µg/L). Die Befruchtungsrate sowie das Wachstum der F1-Generation reagierten weniger empfindlich auf die Belastung (NOEC: 435 µg/L). Für diesen Wirkmechanismus stellte das Sexualsteroid 11-keto-Testosteron den empfindlichen Biomarker im FSA dar. Im Zwei Generationen Test konnte eine Zunahme des Geschlechtshormons im Blutplasma der männlichen Zebraabärblinge der F1-Generation bei nominal 1000 µg/L detektiert werden (NOEC: 435 µg/L). Bei den Weibchen wurde ebenfalls bei 1000 µg/L eine Abnahme des VTG-Gehaltes beobachtet. Als wichtigste mechanistische Erklärung für die beobachteten Wirkungen wird eine Rückkopplungsreaktion vermutet: Die Blockade des Androgenrezeptors führt zu einem Defizit in den vom AR bedienten Effektwegen, was durch eine Anregung der 11-keto-Testosteronproduktion zu kompensieren versucht wird. Diese Erhöhung kann u. a. dadurch geschehen, dass die Aromatase heruntergeregelt wird, um mehr Testosteron zu 11-keto-Testosteron umzubauen. Dadurch wird weniger 17-beta-Östradiol produziert, was die VTG-Produktion einschränkt.

### **3.1.5 Aromatase-Hemmer**

Die Aromatase katalysiert die Bildung des weiblichen Sexualhormons 17-beta-Östradiol aus Testosteron. Die Inhibition dieses Enzyms führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses der aktiven Formen der männlichen und weiblichen Geschlechtshormone und zu einer Vermännlichung. Diese Art der Steroidsynthese-Hemmung ist sehr spezifisch und muss daher von Hemmwirkungen auf die basaleren Schritte der Steroidsynthese unterschieden werden. Letztere sind häufig Ausdruck beginnender systemischer Toxizität und/oder Interaktionen mit dem Corticosteroid-Stoffwechsel.

Ein Fish Sexual Development Test mit Prochloraz (Kinnberg et al., 2007) wies beim Zebraabärbling das Geschlechterverhältnis als sensitivsten populationsrelevanten Endpunkt aus. Bei 202 µg/L wurde eine Verschiebung hin zu einer kompletten Männchen-Gruppe beobachtet (NOEC: 64 µg/L).

Eine Zunahme der VTG-Konzentration bei den männlichen Tieren wurde bereits bei 16 und 64 µg/L Prochloraz beobachtet und war damit deutlich empfindlicher (NOEC: <16µg/L). Die Belastung mit 202 µg/L Prochloraz resultierte dagegen in einer Abnahme des VTG bei männlichen und weiblichen Tieren. Für dieses Wirkprofil bieten sich verschiedene Erklärungsmöglichkeiten an: Zum einen wirkt Prochloraz als Demethylase-Hemmer auch auf andere Enzyme der Steroidogenese. Eine empfindlichere Hemmung der 11-kT-Bildung könnte zunächst zur erhöhten Bildung von 17-beta-Östradiol in Männchen führen, bis bei höheren Konzentrationen auch die Aromatase gehemmt und VTG in beiden Geschlechtern reduziert würde. Zum anderen ist die Aromatase ein in hohem Maße bedarfsreguliertes Enzym, welches in Rückkopplungsmechanismen eingebunden ist. Während begrenzte Einflüsse von Aromatasehemmern zu Kompensationsreaktionen (Aromatase-Bildung) führen, die auch überschießen können, ist die Kompensationskraft bei höheren Konzentrationen wirkungslos. Allerdings ist eine Kompensation im männlichen Geschlecht nicht zu erwarten.

Eine Studie mit Fadrozol (Fenske and Segner, 2004) zeigte in Bezug auf populationsrelevante Effekte korrespondierende Ergebnisse. Zebrabärblinge wurden mit 500 µg Fadrozol/g Futter über 71 Tage belastet und weitere 161 Tage unter Kontrollbedingungen gehalten. Auch hier konnte eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in Richtung der Männchen detektiert werden.

Fadrozol ist ein Arzneimittelwirkstoff, der als Aromatase-Hemmer entwickelt wurde. Er ist deshalb sehr spezifisch. Prochloraz ist ein DMI-Fungizid, welches neben der Aromatase-Hemmung weitere Wirkmechanismen bedient. Der Zusammenhang zwischen DMI-Fungiziden und Aromatase-Hemmung wird in den Kapiteln 3.2.2 und 3.3 näher beleuchtet, da er für die Regulationssituation nach Pflanzenschutzgesetz von besonderer Bedeutung ist (Schaefers, 2007). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zu Aromatase-Hemmern findet sich deshalb in Kapitel 3.2.2.

### 3.1.6 Inhibitor der Testosteron-Synthese (basale Steroidsynthese)

In drei FLCT Studien mit Atrazin mit Zebraquarienfisch, die an unterschiedlichen Prüfstationen durchgeführt wurden (Nagel et al. 2004), wurde konsistent eine signifikante Reduktion der Eiproduktion gezeigt, verbunden mit einer verminderten VTG-Konzentration im Blutplasma der Weibchen. Da der Konzentrationsbereich dieser Wirkungen im Bereich der letalen Toxizität für die empfindlichen Lebensstadien liegt ist von einer allgemeinen und wenig spezifischen Inhibition der Steroidsynthese auszugehen, die unter anderem zu einer Reduktion des Testosteron-Niveaus und damit beider aktiver Sexualhormone (11-kT und E2) sowie des VTG-Spiegels führt. Ob bei einer solchen systemischen Wirkung noch von primär endokrinen Wirkungen gesprochen werden kann, bleibt offen. Wenn man auf die direkten primär sexualendokrinen Wirkungen fokussiert, sollten nur spezifische Interaktionen mit dem Androgen- oder Östrogenrezeptor sowie mit den Bildungsenzymen der aktiven Endformen der Sexualhormone 11-keto-Testosteron oder 17-beta-Östradiol einbezogen werden.



### **3.2 Einordnung der Daten des Umweltbundesamtes**

Das Umweltbundesamt besitzt Datenmaterial aus FLC-Studien, welches in Anmelde- und Zulassungsverfahren genutzt wurde und wird. Dabei handelt es sich zumeist um GLP-Studien mit Pflanzenschutzmitteln oder Allgemeinchemikalien. Vor einer Analyse der Daten wurden die verwertbaren Studien durch Ausschlusskriterien weiter eingegrenzt. Alle Studien, bei denen Wirkungen auf und Interaktionen mit Nervenmembranen von Zielorganismen durch die Testsubstanz hervorgerufen wurden, insbesondere Acetylcholinesterase-Hemmer und Pyrethroide, wurden nicht berücksichtigt, da hier in der Regel akute Wirkmechanismen vorlagen. Unter den verbleibenden 25 Studien befanden sich neun Studien mit DMI-Fungiziden, die dem Wirkmechanismus der Aromatase-Hemmung zugeordnet und gesondert ausgewertet wurden (s. 3.2.2).

#### **3.2.1 Datensatz FLCT, Wirkmechanismus unklar**

Bei den verbliebenen 16 Studien mit unklarem endokrinen Wirkpotenzial wurde anhand der Acute Chronic Ratio (ACR, Quotient aus der  $LC_{50}$  nach 96h und NOEC des empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkts) versucht, Hinweise auf eine evtl. vorliegende relevante sexual-endokrine Wirkung zu erhalten. Als Ausschlusskriterium wurde eine  $ACR < 10$  gewählt. Bei zehn der ausgewählten Studien lag die ACR unter diesem Schwellenwert.

Bei zwei der verbliebenen sechs Studien wurden die verwendeten Tiere mit Hormonen zur Steigerung der Eiproduktion vorbehandelt. Da die potentiell endokrine Wirkung der getesteten Substanz Untersuchungsgegenstand war, wurde die hormonelle Vorbehandlung als zu gravierend eingeschätzt, und die Studien von einer weiteren Bewertung ausgeschlossen. Das gleiche galt für eine Studie, in der während des Testzeitraumes eine medikamentöse Behandlung gegen Parasiten vorgenommen wurde.

Letztendlich verblieben 3 Studien der Datenbank, die anhand des vorgestellten Schemas von sexual-endokrinen Wirkmechanismen eingeordnet werden sollten. Gemeinsam haben diese meist älteren Studien, dass indikative Biomarker wie VTG

nicht bestimmt wurden. Bei zwei der untersuchten Testsubstanzen bildete die Wachstumsrate der F0- Generation den sensitivsten populationsrelevanten Endpunkt, die Reproduktion wurde im getesteten Konzentrationsbereich nicht beeinflusst. Da das Wachstum einen Endpunkt darstellt, der durch viele Wirkmechanismen beeinträchtigt werden kann, ist die Zuordnung zu einem spezifischen Wirkmechanismus nicht möglich. Die dritte bewertete Studie zeigte einen Einfluss der Testsubstanz auf die Reproduktion (Eizahl), was durch eine Verzögerung oder Einstellung der Balz (OR-Agonist, AR-Antagonist), aber auch eine Reduktion der Weibchen (Aromatase-Hemmer) oder, am wahrscheinlichsten, durch systemische Toxizität hervorgerufen worden sein kann.

Weil bei allen Studien Wirkindikatoren und insbesondere molekulare Biomarker nicht untersucht wurden, fehlt wichtige ergänzende Information. Eine Einordnung in das vorliegende Wirkmechanismus-Schema anhand der untersuchten sensitivsten Endpunkte ist daher nicht möglich. Das zeigt die interpretatorische Bedeutung von Wirkindikatoren in FLCTs. Würden die Wirkindikatoren unempfindlich, hingegen Wachstums- oder Reproduktionsendpunkte dennoch empfindlich reagieren, wäre klar, dass der Wirkmechanismus ein chronisch toxischer ist, der nicht direkt sexual-endokrin ist.

### **3.2.2 Datensatz DMI Fungizide**

Pflanzenschutzmittelwirkstoffe aus der Gruppe der DMI-Fungizide weisen aufgrund ihres beabsichtigten Wirkmechanismus (Hemmung der Ergosterol-Biosynthese in Zielpilzen) das Potenzial zur endokrinen Disruption auf, da das gehemmte Zielenzym ein Cytochrom P-450 Enzym ist, das eine hohe Strukturanalogie unter anderem zur Aromatase aufweist. Die Aromatase ist ein zentrales Enzym der Steroid-Biosynthese von Wirbeltieren und Mollusken, welches Testosteron in 17-beta Östradiol umwandelt und damit eine entscheidende Rolle bei der Geschlechtsbestimmung und der Ausprägung spezifisch weiblicher physiologischer Leistungen hat. Der Verdacht von Auswirkungen dieser Fungizide auf das endokrine System von Wirbeltieren wurde für mehrere Vertreter der Stoffgruppe anhand von Langzeitstudien an Säugern und Fischen bestätigt.

Aufgrund von Strukturähnlichkeiten können DMI-Fungizide die Hemmung weiterer Cytochrom P-Enzyme des Steroid-Stoffwechsels hervorrufen, was eine Eingrenzung

des Wirkmechanismus erschwert. Es gestaltet sich schwierig, die Datenlage über mögliche Mechanismen zu präzisieren, da der Großteil der Daten Bestandteil von vertraulichen Industrie-Studien ist. Hinzu kommt, dass in den vorliegenden Studien oftmals die relevanten Endpunkte nicht erfasst wurden. So ist nur indirekt zu erschließen, ob die Aromatase Hemmung tatsächlich den dominanten Wirkmechanismus darstellt. In neun vorliegenden Studien wurden insgesamt sieben DMI-Fungizide untersucht (Schäfers 2007).

Für alle betrachteten DMI-Fungizide erfolgte anhand des Datenmaterials eine Abschätzung der Acute Chronic Ratio (ACR). In der Stoffregulation wird bei unspezifisch wirkenden Substanzen eine Extrapolation von der akuten LC50 auf die chronische NOEC um eine Größenordnung vorgenommen. Eine hohe ACR zeigt einen großen Abstand der Empfindlichkeit des chronischen Endpunktes im Vergleich zur allgemeinen systemischen Toxizität und deutet spezifische Wirkmechanismen an. Bei 9 von 16 Stoffen ist die ACR größer als 100 und liefert somit Hinweise auf die Relevanz des vermuteten spezifischen Wirkmechanismus. Für 5 Substanzen liegt die ACR unter 10 und lässt vermuten, dass im Bereich chronischer Wirkungen eine Trennung zwischen unspezifischer systemischer Toxizität und spezifischer Effekte nicht möglich ist.

FLCT wurden im Wesentlichen mit den Substanzen durchgeführt, für die eine hohe ACR bestimmt werden konnte. Die Reproduktion als wichtiger sexual-endokriner Endpunkt wurde in allen Studien erfasst und repräsentierte in vier Studien den empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt.

Das Geschlechterverhältnis wurde (methodisch oft problematisch) nur für fünf Substanzen bestimmt und erwies sich in drei Studien als empfindlichster Endpunkt. Der Parameter Wachstum wurde in acht Tests für sechs Substanzen ermittelt und zeigte in drei Studien die höchste Empfindlichkeit.

Bezüglich der Endpunkte mit Wirkindikation erwies sich VTG für vier Substanzen als gleich empfindlich wie das Geschlechterverhältnis.

Ein Vergleich der empfindlichsten Endpunkte dokumentierte, dass für die Endpunkte Reproduktion, Geschlechterverhältnis und Wachstum sich die NOEC Werte in fünf von acht Studien nur um den Faktor 1 bis 2,5 unterscheiden.

In Tests, die statisch in einem Wasser/Sediment-System mit einmaliger Peak-Exposition durchgeführt wurden, nahm die Empfindlichkeit der Endpunkte von der Reproduktion über das Wachstum zum Geschlechterverhältnis jeweils zu. Dies ist jedoch nicht auf eine prinzipiell unterschiedliche Empfindlichkeit, sondern auf die jeweils abnehmende Erholbarkeit der Endpunkte zurück zu führen. So erholt sich die Reproduktionsleistung nach Abnahme der Expositionskonzentration meist noch während des Beobachtungszeitraums. Das geringere Wachstum kann bei gutem Futterangebot innerhalb einiger Wochen aufholen. Das einmal entwickelte Geschlecht ist in den untersuchten Fischen jedoch nicht mehr zu verändern.

Für eine weitere Studie wurde der sehr empfindliche Wachstums-Endpunkt als wenig verlässlich bewertet. Andere Tests mit derselben Substanz zeigten ansonsten konsistente Werte.

Die Analyse der FLCT Daten zu den DMI Fungiziden zeigt, dass die Eindeutigkeit des Wirkmechanismus und der empfindlichsten Endpunkte für diese Wirkklasse noch zu wünschen übrig lässt. Dies liegt vor allem an der Tatsache, dass in einigen der vorliegenden Tests wichtige Endpunkte nicht geplant erhoben wurden, was vor allem für den Zeitpunkt der ersten Eiablage und das Geschlechterverhältnis gilt. Da das Geschlechterverhältnis den nachhaltigsten Parameter darstellt, sind noch mehr Informationen nötig. Allerdings legen die vorliegenden Daten eine Dominanz des Wirkmechanismus Aromatase-Hemmung nahe. Zudem liegen die NOECs für die populationsrelevanten Endpunkte Reproduktion, Wachstum und Geschlechterverhältnis nahe beieinander.

### **Vergleich mit Ergebnissen aus Standardtests**

Die Beeinflussung des juvenilen Wachstums wird in den meisten Fällen nicht durch systemische Toxizität hervorgerufen, da die ACR mit Werten größer 100 ermittelt wurde und damit auf spezifische Wirkungen, wie sie endokrine Wirkungen darstellen, hinweist.

Vom UBA und der Industrie zur Verfügung gestellte Daten aus Early Life Stage (ELS) und Juvenile Growth (JG) Tests mit DMI-Fungiziden wurden hinsichtlich ihrer

Empfindlichkeit miteinander verglichen, um die Empfindlichkeit des Parameters Wachstum in verschiedenen Lebensabschnitten zu untersuchen.

Für sechs Substanzen wurden Wachstums-NOECs in ELS oder JG-Tests bestimmt. In allen Fällen lagen die Testergebnisse nah beieinander und lassen den Schluss zu, dass beide Testverfahren für den Wirkmechanismus bezüglich des Endpunktes Wachstum den gleichen Wert für die Ableitung einer regulativen NOEC besitzen.

Der Vergleich der empfindlichsten populationsrelevanten NOECs aus FLCTs und der NOECs von ELS und JG-Tests zeigt, dass für alle Substanzen mit empfindlichen chronischen Daten der empfindlichste ELS/JG-NOEC empfindlicher oder ebenso empfindlich ist wie der FLCT-NOEC. Der einzige Wert mit höherer Empfindlichkeit der FLCT-NOEC weist eine sehr geringe ACR auf (ACR zur ELS-NOEC = 4; ACR zur FLCT-NOEC = 20). Da es sich bei dem empfindlichsten Endpunkt des FLCT um Wachstum handelt, ist also ein allgemeinerer Wirkmechanismus als die Aromatase-Hemmung denkbar.

Zur Abschätzung der Aussagesicherheit der Extrapolation von ELS oder JG-NOECs auf FLCT-NOECs wurden für die sieben Substanzen, für die valide FLCTs zur Verfügung stehen, alle vorhandenen NOECs aus ELS- oder JG-Tests zu den empfindlichsten NOECs aus den FLCTs in Beziehung gesetzt. Die obere 99,9 %-Vertrauensgrenze des Mittelwertes der NOEC-Verhältniszahlen von ELS oder JG Tests zu FLCTs liegt bei 4,6. So wird ein Extrapolationsfaktor von 1/5 auf die NOEC erreichter ELS oder JG-Studien für DMI-Fungizide als ausreichend sicher erachtet, um eine vorläufige Risikobewertung vorzunehmen und Daten im definitiven Test zulassungsbegleitend zu erheben.

### **Vergleich mit Ergebnissen aus FSA und FSDT-Tests**

Fish Screening Assays (FSA, kurz vor der Implementierung als OECD-Verfahren) werden durchgeführt, um einen aus Vorinformationen (Wirkmechanismus, Toxikologie, *in vitro*-Tests) abgeleiteten Verdacht *in vivo* zu bestätigen. Sie umfassen eine 21tägige Exposition reproduzierender Tiere mit Bestimmung der VTG-Konzentration (alle Fischarten) und der sekundären Geschlechtsmerkmale (Medaka und Dickkopfelritze). Fish Sexual Development Tests (FSDT, zurzeit im Validierungsverfahren der OECD) sind erweiterte ELS-Tests, die bis zur Geschlechtsentwicklung

unter Belastung weitergeführt werden und neben den ELS-Endpunkten das Geschlechterverhältnis, histologische Endpunkte und meist auch VTG-Bestimmungen umfassen.

Für einen fundierten Vergleich der empfindlichsten Endpunkte aus FLCTs mit denen aus FSAs (z. T. mit enthaltenen Reproduktionsendpunkten) oder FSDT ist die Datenlage für DMI-Funizide bislang nicht ausreichend. Lediglich für vier Substanzen gibt es Informationen aus diesen spezifischen Tests auf endokrin vermittelte Wirkungen. Für drei Substanzen wurde VTG bestimmt, für zwei Substanzen das Geschlechterverhältnis und für eine Substanz die Reproduktion mit erfasst. Für drei weitere Substanzen ohne FLCT-Daten liegen FSA-Ergebnisse vor.

Alle VTG-NOECs oder  $EC_{10}$  lagen im Bereich von Faktor 2 zu den NOECs bezüglich des Geschlechterverhältnisses im FLCT und deckten sich mit den dort erhobenen VTG-NOECs, wenn vorhanden. Die in einem Fall mit erfasste Reproduktion hatte den identischen NOEC und war konsistent mit dem entsprechenden FLCT-NOEC (177  $\mu\text{g/L}$  gegenüber  $> 85 \mu\text{g/L}$ ). Die NOEC des Geschlechterverhältnisses war in einem FSDT identisch mit der VTG-Bestimmung der empfindlichste Endpunkt. Für eine andere Substanz war der NOEC des Geschlechterverhältnisses im FLCT nicht erhoben worden. Der FSDT lieferte einen ähnlichen Wert wie die populationsrelevanten Endpunkte im FLCT, aber darüber hinaus einen deutlich empfindlicheren histologischen NOEC bezüglich Lebertoxizität. Dieser Wert war empfindlicher als die FLCT-Daten, aber nahe dem empfindlichsten Wachstums-NOEC aus den ELS/JG-Studien.

Insgesamt kann gesagt werden, dass von den vorliegenden FSA- und FSDT-Daten kein Hinweis abgeleitet werden kann, dass sie nicht prädiktiv für einen FLCT wären (FSA) oder nicht ebenso empfindliche Ergebnisse (FSDT) lieferten. Eine Verbreiterung der Datenbasis ist wünschenswert.

### **Vergleich der Fischspezies bezüglich Aromatase-Hemmung**

Von den neun FLCT wurden vier mit der Dickkopfelritze, drei mit dem Zebraärbbling und zwei mit der Schafskopfelritze durchgeführt. Nur für zwei Substanzen liegen vergleichbare Daten für Dickkopfelritze und Zebraärbbling vor, die darauf hindeuten, dass beide Fischarten grundsätzlich über ähnliche Empfindlichkeiten verfügen. Es scheint in der Ausprägung der Wirkungen Unterschiede dahingehend zu geben, dass

der Zebrabärbling durch seinen Mechanismus der Geschlechtsentwicklung (Umformung der protogynen Gonade in werdenden Männchen, vermutlich ausgelöst durch das Verhältnis der Hormontiter) auf eine Aromatasehemmung sensitiver reagiert als die Dickkopfelnritze, die offensichtlich über ein größeres Kompensationspotenzial durch Gegenregulation verfügt. Andererseits scheint die Dickkopfelnritze durch ihr größeres absolutes Wachstum eine diesbezüglich statistisch schärfere Aussage zu ermöglichen. Bei Reproduktionsparametern liefert wiederum der Zebrabärbling durch die größere Menge und Homogenität der Eiproduktion bei vergleichbarem Aufwand potenziell statistisch schärfere Ergebnisse. Diese Aussagen speisen sich aus langjähriger Test- und Bewertungserfahrung und lassen sich so nicht aus den begrenzten Daten ableiten. Sie stehen aber nicht im Widerspruch zu diesen.

Die meisten FLCT mit der Dickkopfelnritze sind ältere Tests, die überwiegend in den USA durchgeführt wurden. Ihr Fokus war noch nicht auf endokrinen Endpunkten, was einen Vergleich schwierig macht.

Durch die Eigenschaften des betrachteten Wirkmechanismus sind offensichtlich alle populationsrelevanten Endpunkte von ähnlicher Empfindlichkeit. Somit ist hinsichtlich der potenziellen Empfindlichkeit der Spezies keine Empfehlung abzuleiten.

### **Zusammenfassung Aromatase-Hemmer**

Bezüglich der Spezifität der Biomarker für bestimmte Wirkmechanismen können folgende Aussage getroffen werden:

- Eine Zunahme der VTG-Konzentration wird ausschließlich durch ÖR-Agonisten hervorgerufen und kann in beiden Geschlechtern gemessen werden. Sie geht mit einer Verringerung der 11-kT-Konzentration im Blut der Männchen einher, was wohl auf eine Rückkopplungsreaktion zurückgeführt werden kann. Die übermäßig hohe Konzentration der Wirkprodukte der Rezeptor-Aktivierung veranlasst, dass die Produktion von Testosteron als Ausgangsprodukt für 17-beta-Östradiol und 11-keto-Testosteron heruntergefahren wird.

Alle anderen Wirkmechanismen sind weniger deutlich zu identifizieren

- Eine Zunahme von 11-kT wird vermutlich durch eine Kompensationsreaktion aufgrund zu niedriger Wirkprodukte (AR-Antagonisten), durch einen Über-

schuss nicht verarbeiteten Testosterons (Aromatase-Hemmung) oder beides (ÖR-Antagonisten) hervorgerufen. Die Unterscheidung kann am ehesten anhand der gleichzeitigen Abnahme von VTG bei Aromatase-Hemmung (und bei Medaka und Dickkopfelritze wohl anhand sekundärer männlicher Geschlechtsmerkmale) getroffen werden (Abnahme bei AR-Antagonisten Zunahme bei Aromatase-Hemmung). Im Fall der ÖR-Antagonisten ist wegen der sich überlagernden Kompensationen durch Anregung der Testosteronsynthese und Aromatase-Produktion mit stoff- und artspezifischen Unterschieden zu rechnen.

- Eine gleichzeitige Abnahme von VTG und 11-kT deutet auf Hemmung basalerer Schritte der Steroid-Synthese zum Testosteron hin. Ob eine spezifische Aromatase-Hemmung hinzu kommt (DMI-Fungizide), ist wohl am besten anhand des Abstandes zur akuten Toxizität zu beurteilen.

Für den Wirkmechanismus AR-Agonist stellt das Geschlechterverhältnis den relevanten und empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt. Ähnlich empfindlich zeigt sich in den vorliegenden Tests mit DMI-Fungiziden das juvenile Wachstum. Damit einhergehend ist auch der Zeitpunkt der ersten Eiablage häufig herausgeschoben. In Tests, in denen dieser nicht festgehalten wird, kann sich das in der Fekundität niederschlagen. Ob diese Wirkkette auf Aromatase-Hemmung oder auf begleitende Hemmungen der basalen Steroid-Synthese zurückgeht, ist anhand der vorliegenden Endpunktdaten nicht zu klären.

Als indikativer Endpunkt mit korrespondierender Empfindlichkeit ist die Abnahme der VTG-Konzentration im Blut weiblicher Tiere zu nennen.

Für die untersuchten DMI-Fungizide scheint die Aromatase-Hemmung der dominante Wirkmechanismus zu sein. Weitere Hemmungen der basalen Steroid-Synthese oder der 11-keto-Testosteron-Bildung können aufgrund der Biomarker-Antworten vermutet werden (s. FSDT Prochloraz oder eigene FSAs, Kapitel 3.3).

### ***3.3 Vergleich der Ergebnisse mit Daten aus Kurzzeit-Tests (FSA)***

FLCT und Zwei Generationen Tests sind mit hohem Kosten- und Zeitaufwand verbunden. Ein Kurzzeit Screening Test mit Fisch (Fish Screening Assay, FSA) ist in der



Validierungsphase durch die OECD. Ziel ist eine sichere Indikation sexual-endokriner Wirkungen, die mit Daten aus weitergehenden Testverfahren, deren Endstufe der Zwei-Generationen-Test darstellt, bewertet werden sollen. Der FSA beinhaltet die Erfassung des Biomarkers VTG nach 21 Tagen Belastung.

Bezüglich der Testgestaltung wird im Rahmen der Validierung die Eignung der verwendeten Biomarker VTG und sekundäre Geschlechtsmerkmale überprüft. Des Weiteren sollte aber auch eine Aussage darüber erfolgen, ob die verwendeten Indikatoren in der Lage sind, Vorhersagen über die Wirkung der Substanz im endstufigen Test zu leisten, um die Eignung als Ausstiegskriterium aus der weiteren Testung oder zur Klärung des im definitiven Test einzusetzenden Konzentrationsbereichs festzustellen. Von zentraler Bedeutung ist die Frage der Eignung des FSA für die verschiedenen Wirkmechanismen. Zur Abklärung der relativen Empfindlichkeit von Wirkindikatoren und populationsrelevanten Endpunkten wurden am Fraunhofer IME Tests mit repräsentativen Stoffen für alle wesentlichen sexual-endokrinen Wirkmechanismen durchgeführt. Dabei wurden in Kurzzeittests über 14 oder 21 Tage die Biomarker VTG und 11-keto-Testosteron im Blut gemessen, sowie zum Teil Fekundität und Fertilität erfasst. Ziel war zum einen die Detektion von Effektsyndromen, die eine Einschätzung des Mechanismus und eine Triggerung und Fokussierung weiterführender Tests ermöglichen könnte. Zum anderen soll geklärt werden, ob für die Biomarker in Kurzzeittests in allen Fällen sichergestellt werden kann, dass keine falsch negativen Resultate erzielt werden, da ansonsten der Einsatz als Trigger in einer gestuften Teststrategie fraglich ist. Tabelle 5 fasst die beobachteten Effekte auf die Biomarker zusammen und nennt für den FSA die empfindlichen Reproduktions-Endpunkte sowie für den FLCT und Zwei-Generationen-Test die empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkte. Tabelle 6 zeigt die berechneten Effektschwellen für die Biomarker im FSA und gegenübergestellt die Effektkonzentrationen der empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkte.

**Tabelle 5: Effektsyndrome für Zebraabürblinge nach Belastung im FSA und Life Cycle Test mit verschiedenen sexual-endokrinen Stoffen; + Zunahme; - Abnahme; 0 kein Effekt; n.b. nicht bestimmt. Zusätzlich sind die empfindlichsten untersuchten populationsrelevanten Endpunkte aufgeführt.**

Wirkmechanismus	Substanz	FSA			Life Cycle Test/ Zwei Generationen Test		
		Vitello- genin	11-keto- Testo- steron	Repro- endpunkt	Vitello- genin	11-keto- Testo- steron	Populations- relevanter Endpunkt
Stark	Ethinylöstradiol	+	-		+	n.b.	Fertilität
ÖR-Agonist	Alkylphenole	+	-	Fertilität	+	n.b.	Fertilität
Schwach	Bisphenol A	+	-		+	n.b.	Fertilität
ÖR-Antagonist	Tamoxifen- Citrat	-			-	+	Fertilität
AR-Agonist	Trenbolon	0	0		0	0	Geschlechter- verhältnis
AR-Antagonist	Flutamid	0	+	Eizahl	-	+	Eizahl
Aromatase-Inhibitor	Fadrozol	-	+	Eizahl	n.b.	n.b.	n.d
	DMI-Fungizid	-	(-)	Eizahl	-	(-)	Geschlechter- verhältnis
Inhibitor der Testosteron- synthese	3,4-DCA	-	-		n.b.	-*	Eizahl
	Atrazin	-	-		-		

\* Allner 1997: 11-kT Hemmung im Dreistachligen Stichling

Bezüglich der Spezifität der Biomarker für bestimmte Wirkmechanismen können folgende Aussage getroffen werden:

- Eine Zunahme der VTG-Konzentration wird ausschließlich durch ÖR-Agonisten hervorgerufen und kann in beiden Geschlechtern gemessen werden. Sie geht mit einer Verringerung der 11-kT-Konzentration im Blut der Männchen einher, was wohl auf eine Rückkopplungsreaktion zurückgeführt werden kann. Die übermäßig hohe Konzentration der Wirkprodukte der Rezeptor-Aktivierung veranlasst, dass die Produktion von Testosteron als Ausgangsprodukt für 17-beta-Östradiol und 11-kT heruntergefahren wird.

Alle anderen Wirkmechanismen sind weniger deutlich zu identifizieren

- Eine Zunahme von 11-kT wird vermutlich durch eine Kompensationsreaktion aufgrund zu niedriger Wirkprodukte (AR-Antagonisten), durch einen Über-

schluss nicht verarbeiteten Testosterons (Aromatase-Hemmung) oder beides (ÖR-Antagonisten) hervorgerufen. Die Unterscheidung kann am ehesten anhand der gleichzeitigen Abnahme von VTG bei Aromatase-Hemmung (und bei Medaka und Dickkopflritze wohl anhand sekundärer männlicher Geschlechtsmerkmale) getroffen werden (Abnahme bei AR-Antagonisten Zunahme bei Aromatase-Hemmung). Im Fall der ÖR-Antagonisten ist wegen der sich überlagernden Kompensationen durch Anregung der Testosteronsynthese und Aromatase-Produktion mit stoff- und artspezifischen Unterschieden zu rechnen.

- Eine gleichzeitige Abnahme von VTG und 11-kT deutet auf Hemmung basaler Schritte der Steroid-Synthese zum Testosteron hin. Ob eine spezifische Aromatase-Hemmung hinzu kommt (DMI-Fungizide), ist wohl am besten anhand des Abstandes zur akuten Toxizität zu beurteilen.

**Tabelle 6: Effektkonzentrationen für Zebraabälblinge nach Belastung mit verschiedenen sexualendokrinen Stoffen**

Wirkmechanismus	Substanz	FSA (Biomarker)		Life Cycle Test/ Zwei Generationen Test (Population)	
		EC10	EC50	EC10/NOEC	EC50
Stark ÖR-Agonist	Ethinylöstradiol	1.1 ng/L	3.1 ng/L	0.6 ng/L	1.1 ng/L
Schwach	Bisphenol A (initial)	375 µg/L	639 µg/L	390 µg/L	1410 µg/L (Fertilität)
ÖR-Antagonist	Tamoxifen- Citrat	0.1 µg/L	3.0 µg/L	1.2 µg/l	8.6 µg/L (Fertilität)
AR-Agonist	Trenbolon		> 90 ng/L	3 ng/L (Sex ratio)	n.b.
AR-Antagonist	Flutamid	47 µg/L	700 µg/L	256 µg/L	740 µg/L (Eizahl)
Aromatase-Inhibitor	DMI-Fungizid	22 µg/L	49 µg/L	19 µg/L	86 µg/L (Sex ratio)
Inhibitor der Testosteron- Synthese	3,4-DCA	96 µg/L	152 µg/L	117 µg/L**	141 µg/L**
	Atrazin	67 µg/L	730 µg/L	n.b.	30-4270 µg/L*** (Eizahl)

\*\* Rohdaten aus (Ensenbach, 1991), nur Eiproduktion (ELS empfindlicher)

\*\*\* Nagel et al. 2004

n.b.: nicht bestimmt

Die Biomarker als indikative Endpunkte im FSA zeigten korrespondierende Empfindlichkeiten zu den empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkten in Life-Cycle und Zwei Generationen Tests für alle untersuchten sexual-endokrinen Wirkmechanismen. Die Ausnahme bildet der Wirkmechanismus der Androgen-Rezeptor-Agonisten. Hier erwiesen sich die verwendeten Biomarker als deutlich zu unempfindlich.

Die Ergebnisse belegen somit die Relevanz und Anwendbarkeit des FSA zur Indikation einer potentiell sexual-endokrinen Wirkung *in vivo* für Wirkmechanismen, die die Bildung von 17-beta-Östradiol und den Östrogenrezeptor betreffen.

Wirkmechanismen, die spezifisch die Bildung von 11-keto-Testosteron und den Androgenrezeptor betreffen, sind hingegen unzureichend abgebildet. Bei Erfassung des Biomarkers 11-keto-Testosteron bliebe nur eine Erfassungslücke für Androgenrezeptor-Agonisten, die durch die Identifikation weiterer empfindlicher Biomarker geschlossen werden müsste.

### **3.4 Ableitung einer Teststrategie für Fische**

Als Fazit aus den vorangestellten Ausführungen wird eine gestufte Teststrategie für Fische hinsichtlich der Feststellung und Bewertung sexual-endokriner Wirkungen vorgeschlagen. Auf der Grundlage der vorliegenden Informationen scheint ein zweistufiges Konzept mit einer vorgeschobenen Basisstufe ausreichend (Schäfers und Teigeler 2005).

In einer Basisstufe (deren Einschätzung und Bewertung nicht Teil dieses Projektes ist) müsste eine Identifikation des Potenzials einer sexual-endokrinen Wirkung durch den Stoff erfolgen, also ein für eine weitere Prüfung ausreichender Anfangsverdacht gebildet werden.

In der folgenden Stufe 1 erfolgt ein Screening in Form des FSA mit dem Ziel einen sexual-endokrinen Verdacht *in vivo* zu bestätigen. Der Screening-Test sollte so durchgeführt werden, dass die erzielten Ergebnisse als Trigger für die Endstufe dienen können, in der die Populationsrelevanz der Stoffwirkungen evaluiert wird, aber ebenso gut auch das Ausstiegskriterium aus der weiteren Testung liefern können. Die NOEC könnte etwa im Bereich von Faktor 10 unterhalb der akuten LC<sub>50</sub>

sein. Eine derartige Verwendung in einem Stufenkonzept ist bei der derzeitigen Ausrichtung des FSA schwierig, da FSA-Daten zumeist nur für drei Konzentrationen mit größerem Spacing erhoben wurden und eine NOEC- oder ECx-Bestimmung unterbleibt. Es ist zu bedauern, dass die Einordnung des FSA als reiner Screening-Test die Erhebung brauchbarer Daten für Zwecke der Risikobewertung erschwert.

Eine Zwischenstufe scheint für die meisten Wirkmechanismen überflüssig zu sein. Der FSDT wird als ungeeignet für eine Zwischenstufe angesehen, da er

- entweder die wesentlichen populationsrelevanten Endpunkte nicht enthält (z. B. Reproduktion), damit unempfindlich ist und einen FLCT nicht triggern kann
- oder als Teil des FLCT die empfindlichste Phase abbildet (z. B. Sexualentwicklung) und damit einen FLCT ersetzen kann.

Es ist also lediglich zu diskutieren, ob das im Vergleich zum FLCT verkürzte Verfahren als Endstufetest anzuwenden ist oder nicht.

Welche Testform die Endstufe beinhaltet, hängt von dem vorhandenen Wissen über die erwarteten Wirkzusammenhänge ab. Generell liefert ein FLCT bzw. Zwei-Generationen-Test die umfassendste Datenlage bezüglich populationsrelevanter Effekte. Ob ein FLCT oder ein 2-Generationen-Test notwendig ist, hängt davon ab, wie maternale Effekte bewertet werden. Das vorliegende Datenmaterial konnte zur Erkennung von und der Beurteilung der Empfindlichkeit maternaler Effekte zumeist nicht herangezogen werden und reicht damit keinesfalls für angemessen verlässliche und allgemeingültige Aussagen über die Relevanz solcher transgenerationalen Wirkungen aus. Nur in einigen Fällen (Aromatase-Inhibition) gab es Hinweise aus Versuchen mit verschiedenen Expositionsfenstern, die nicht für eine Absenkung des regulatorisch relevanten NOEC durch maternale Effekte sprachen.

Ein FLCT oder Zwei-Generationen-Test kann nur durch ein verkürztes Testverfahren abgelöst werden, wenn der vorliegende Wirkmechanismus eindeutig definiert ist, was eigentlich nur bei Wirkstoffen (Pharmazeutika, Pflanzenschutzmittel, Biozide) gegeben ist. Es muss gewährleistet sein, dass der für den Wirkmechanismus charakteristische empfindlichste populationsrelevante Endpunkt im verkürzten Testverfahren hinreichend untersucht wird und eine Exposition während des empfindlichsten Lebensstadiums gewährleistet ist. Dazu müssen für den

Wirkmechanismus repräsentative vergleichbare Referenzdaten aus FLCT/Zwei-Generationen-Tests und verkürztem Verfahren verfügbar sein.

Für die meisten Wirkmechanismen scheint zu gelten, dass das empfindlichste Expositionsfenster die Phase der Geschlechtsentwicklung ist. Die Ausnahmen Androgenrezeptor-Antagonisten und Hemmung der basalen Steroid-Synthese sind im ersten Fall noch unzureichend belegt und im zweiten Fall möglicherweise nicht als primär endokrin vermittelte Wirkungen einzuordnen. Somit scheiden alle partiellen Life Cycle Test-Protokolle, die die Phase der Geschlechtsentwicklung ausschließen, als Endstufe-Tests aus. Das reduzierteste Testverfahren, welches die Geschlechtsentwicklung in Exposition und Endpunkten erfasst, ist der FSDT. Ob dieser einen FLCT oder Zwei-Generationen-Test ersetzen kann, hängt von der empfindlichsten populationsrelevanten Manifestation des während der Geschlechtsentwicklung gesetzten Effekts ab. Ist dies das Geschlechterverhältnis, wie bei AR-Agonisten oder Aromatase-Hemmern, sollte der FSDT ausreichen. Sind dies Reproduktionsparameter, wie im Fall der ÖR-Interaktionen, greift der FSDT diesbezüglich zu kurz. Aus den vergleichsweise umfangreichen Daten zu ÖR-Agonisten kann abgeleitet werden, dass indikative Endpunkte wie VTG oder sekundäre Geschlechtsmerkmale dieselbe Empfindlichkeit zeigen wie die Befruchtungsrates. Außerdem ist fischartspezifisch das Geschlechterverhältnis oder die Entwicklungszeit zur Geschlechtsreife vergleichbar empfindlich, ebenso wie die juvenilen Wachstumsparameter. Allerdings ist die statistische Schärfe und die Populationsrelevanz der Befruchtungsrates höher einzuschätzen (Young et al. 2002). So bleibt es letztlich der bewertenden Behörde überlassen, ob sie die verbleibende Restunsicherheit toleriert oder wie sie diese adressiert.

## **4 Zusammenfassende Beantwortung der Projekt-Fragestellungen**

Im Folgenden werden die im Rahmen der Projekterstellung formulierten Fragestellungen beantwortet. Dazu werden die Informationen aus den am IME durchgeführten sowie den in der Literatur und beim Umweltbundesamt verfügbaren Studien herangezogen.

**Frage1: Lassen sich für spezifische sexual-endokrine Wirkmechanismen besonders empfindliche Lebensstadien oder Lebensleistungen identifizieren?**

Aus den vorliegenden Daten können Hinweise auf besonders empfindliche Lebensstadien für die Belastung und auf besonders empfindliche Lebensleistungen, in denen sich eine sexual-endokrine Wirkung über einen bestimmten Wirkmechanismus manifestiert, abgeleitet werden. Diese Hinweise sind verlässlicher, je mehr Informationen einem Mechanismus zugeordnet werden können und wenn sich Informationen aus unterschiedlichen Testmethodiken zu einem plausiblen Gesamtbild fügen. Die Datenlage lässt eine fundiertere Betrachtung nur für Östrogenrezeptor-Agonisten und Aromatase-Hemmer zu. Die Aussagen zu anderen Mechanismen sind mit größerer Unsicherheit behaftet.

Für **Östrogenrezeptor-Agonisten** zeigten sich die Reproduktionsendpunkte, insbesondere die Befruchtungsrate, als sehr empfindlich. In einem ähnlichen Empfindlichkeitsbereich bewegten sich das juvenile Wachstum und der Zeitpunkt der ersten Eiablage, also die Generationsdauer. Ein Mehrgenerationentest mit EE2-Belastung innerhalb unterschiedlicher Zeitfenster zeigte, dass der Zeitraum der Sexualentwicklung das sensitivste Zeitfenster für die Auslösung von Wirkungen ist. Allerdings scheint die Manifestation der Wirkungen während der Reproduktionsphase den empfindlichsten Endpunkt zu stellen. Als indikativer Biomarker war die VTG-Induktion gleich empfindlich. Für **Östrogenrezeptor-Antagonisten** deuten die wenigen Daten auf eine Entsprechung der Situation bei Agonisten mit umgekehrten Vorzeichen hin.

**Androgenrezeptor-Agonisten** beeinflussen vor allem die Geschlechtsentwicklung (empfindlichstes Belastungsfenster) und rufen damit einen nachhaltigen Effekt auf das Geschlechterverhältnis hervor (empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt). Biomarker waren teilweise weniger empfindlich, was bedeutet, dass der FSA in seiner jetzigen Form für die Indikation einer derartigen Wirkung nicht geeignet ist.

Der **Androgenrezeptor-Antagonist** rief eine Reduktion der Befruchtungsrate hervor, die auf gleicher Empfindlichkeitsstufe mit den indikativen Biomarkern reagierte. Allerdings wurde der NOEC für die Eiproduktion bereits eine Konzentrationsstufe niedri-

ger ermittelt. Sie ging mit einer Reduktion des Balzverhaltens einher. Somit ist die empfindlichste Manifestation während der Reproduktion. Das sensitivste Zeitfenster der Belastung ist aus den Daten nicht sicher abzuleiten. Die schnelle und wiederholte Wiedererholung von Balzverhalten und Reproduktionsleistung innerhalb schwankender Testkonzentrationen deutet jedoch darauf hin, dass auch das sensitivste Belastungsfenster der Zeitraum der Reproduktion ist. Es muss darauf hingewiesen werden, dass eine Extrapolation der Ergebnisse auf den allgemeinen Wirkmechanismus nur unter großen Vorbehalten möglich ist, da nur eine Studie in die Auswertung einbezogen werden konnte.

Die **Hemmung der Aromatase** bewirkte nach Belastung der Phase der Sexualentwicklung eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses. Damit einher gingen meist ebenso empfindliche Verzögerungen des Wachstums. Auch die Reproduktion reagierte teilweise auf derselben Empfindlichkeitsstufe, was mit einem verspäteten Eintritt in die Reproduktionsphase zusammenhängen kann. Diese Zusammenhänge können aufgrund der verhältnismäßig großen Zahl an Studien mit DMI-Fungiziden, bei denen zumindest eine wesentliche Wirkung die Hemmung der Aromatase ist, relativ sicher angenommen werden.

Die **Hemmung der basalen Steroidsynthese** manifestierte sich in Form einer reduzierten Eiablage. Dieser ging mit einem substanzinduzierten Ausfall des Balzverhaltens einher. Da eine allgemeine Steroid-Synthese-Hemmung den unspezifischsten Mechanismus darstellt, sind systemische Wirkungen nicht ausgeschlossen. Es ist damit fraglich, ob in diesem Fall überhaupt von primär endokrinen Wirkungen gesprochen werden kann.

Für alle Mechanismen, für die diesbezügliche Aussagen abgeleitet werden können, gilt: Das empfindlichste Belastungsfenster stellt die Sexualentwicklung dar, auch wenn sich die Wirkung unterschiedlich spät manifestieren kann.



**Frage 2: Gibt es für spezifische sexual-endokrine Wirkmechanismen Regelmäßigkeiten für eine abgestufte Empfindlichkeit verschiedener Endpunkte?**

Empfindliche Endpunkte und empfindliche Lebensphasen müssen nicht zwangsweise zusammenfallen. So können Testverfahren, die das empfindlichste Expositionsfenster beinhalten, im Falle einer späteren Manifestation der Wirkung den nachweislich empfindlichsten Endpunkt nicht einbeziehen. Dies gilt beispielsweise für Prüfungen von Östrogenrezeptor-Agonisten im FSDT, der die Reproduktion inklusiv der Befruchtungsrates ausschließt. Die Empfindlichkeit reduziert sich aber auch, wenn zwar der potenziell empfindlichste Endpunkt der Manifestation untersucht wird, das empfindlichste Belastungsfenster aber nicht in die Exposition eingeschlossen ist, wie etwa bei Kurzzeit-Reproduktionstests.

***Populationsrelevante Endpunkte***

Bezüglich populationsrelevanter Endpunkte können im Wesentlichen Entwicklungsendpunkte von reproduktiven Endpunkten unterschieden werden. Für die Wirkmechanismen mit besserer Datenlage ist das empfindlichste Expositionsfenster die Phase der Sexualentwicklung. Die Wirkung manifestiert sich bei ÖR-Interaktionen in Reproduktions- und Entwicklungsendpunkten.

Bei ÖR-Agonisten weist die Befruchtungsrates die höchste Empfindlichkeit auf, gefolgt vom juvenilen Wachstum (daran gekoppelt der Zeitpunkt der ersten Eiablage) und dem Geschlechterverhältnis bei Medaka und Dickkopfelritze, bzw. der Entwicklungsverzögerung bis -hemmung bei männlichen Zebrabärblingen. Die reduzierte Fekundität beruht wahrscheinlich auf fehlenden Balzreizen durch die Männchen. Ob Schädigungen in Ovarien auf primäre Effekte (Überproduktion von Eiern), indirekte Effekte wie Legestau durch fehlende Balz oder beides zurückzuführen ist, bleibt offen.

Aromatase-Hemmer beeinträchtigen die Sexualentwicklung (Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu Männchen), was offenbar mit einer Verzögerung des juvenilen Wachstums einhergeht. Die manchmal beobachtete Reduktion der Fekundität kann auf die reduzierte Zahl funktionaler Weibchen zurückgehen (z.B. wenn keine gonadenhistologische Geschlechtsdifferenzierung erfolgte), dem verspäteten Eintritt der Weibchen in die Reproduktionsphase geschuldet sein oder durch eine Hemmung der Aromatase im Hirn verursacht werden, was

entwickelte Weibchen an der Eiablage hindern kann (Hinweise aus eigenen GLP-Studien mit DMI-Fungiziden).

#### Die Ansicht von Crane und Matthiessen

“Selection of appropriate endpoints to use in fish life cycle tests requires scientists and regulators to decide the following:

- a. First, what endpoints are of biological, and therefore regulatory, importance;
- b. Second, are these endpoints sensitive and, if so, what level of effect would be of biological, and therefore regulatory, importance;
- c. Finally, what is the power to detect the biologically important level of effect in that endpoint.

Omission of any of the above when deciding on preferred endpoints is likely to lead to suboptimal choices.”

ist zu unterstützen. Im Fraunhofer IME liegt ein Populationsmodell für den Zebraäbrbling vor, mit dessen Hilfe die relativen Bedeutungen verschiedener Parameter für Modellpopulationen berechnet werden können.

#### **Indikative Endpunkte**

Die Empfindlichkeit indikativer Endpunkte ist in FSAs für die Verwendung in einem Stufenkonzept entscheidend, da keine falsch negativen Ergebnisse erzielt werden sollen/dürfen. Der Biomarker VTG scheint ein diesbezüglich sicherer Anzeiger für Wechselwirkungen mit dem weiblichen Hormonsystem (ÖR-Interaktionen, Aromatase-Hemmung) zu sein, da er ähnlich empfindlich wie der jeweils empfindlichste populationsrelevante Endpunkt reagiert. Bei AR-Rezeptor-Interaktionen erweist sich VTG als ungeeignet, da deutlich unempfindlicher als populationsrelevante Endpunkte. Für AR-Antagonisten erwies sich 11-kT als gleich empfindlich, für AR-Agonisten ist ein Biomarker mit gleicher Empfindlichkeit wie populationsrelevante Endpunkte noch nicht identifiziert. Fischarten mit eindeutig bestimmbar sekundären Geschlechtsmerkmalen besitzen in diesen gut zu untersuchende und empfindliche Indikatoren, die jedoch bei starker Territorialität (s. Dickkopfritze) teilweise unterdrückt sein können.

Im Fall der Aromatase-Hemmung in Männchen kann bei geringer Varianz innerhalb der Gruppe und ausreichender Empfindlichkeit des Assays die Reduktion der VTG-Konzentration sogar empfindlicher als bei Weibchen sein und damit höher als die des empfindlichsten populationsrelevanten Endpunktes. Da in Männchen die VTG-Konzentration ohne physiologische Bedeutung ist und der damit repräsentierte 17-beta-Östradioltiter offenbar weniger wichtig als bei Weibchen, ist eine Gegenregulation

durch Heraufregulation der Aromatase, wie sie bei Weibchen im Bereich der Reaktionsnorm üblich ist, nicht notwendig. Somit ist der Endpunkt empfindlicher, eben weil er nicht populationsrelevant ist. Für die Abschätzung populationsrelevanter Wirkung infolge anti-östrogener Wirkmechanismen wird es daher als ausreichend erachtet, VTG nur in Weibchen zu untersuchen, so wie es generell ausreicht, 11-kT in Männchen zu untersuchen.

Im FLCT sind indikative Endpunkte für eine direkte Bestimmung einer regulativen NOEC nicht notwendig. Sie liefern jedoch wertvolle Hinweise auf den Wirkmechanismus, der bei einer bestimmten Konzentration dominant ist. So können etwa DMI-Fungizide verschiedene Cytochrom P-Enzyme der Steroidsynthese mit unterschiedlichen Affinitäten hemmen. Dadurch treten empfindliche Effekte bei niedrigen Konzentrationen auf, die aber bei höheren Konzentrationen von anderen Effekten, die weniger empfindlich, aber physiologisch bedeutsamer sind, überdeckt oder aufgehoben werden können. Weiterhin können Kompensationsreaktionen, etwa im Rahmen von Rückkopplungsmechanismen, in einem mittleren Konzentrationsbereich wirken, die bei niedrigeren Konzentrationen noch nicht ausgelöst werden und bei höheren Konzentrationen nicht mehr effektiv sind. Beide Prozesse können mit Blick auf einzelne Endpunkte sogenannte U-shape (bezüglich Wirkung) oder inverted U-shape (bezüglich Integrität des Endpunkts) erzeugen. Die Betrachtung verschiedenen Wirkindikatoren ist für die Interpretation der Ergebnisse, die Fokussierung der Betrachtung auf bestimmte populationsrelevante Endpunkte und die Erstellung eines konsistenten Gesamtbildes von Bedeutung.

Dies gilt in besonderem Maße auch für histologische Endpunkte. Diese sind schwierig normierbar, quantifizierbar und statistisch auswertbar. Die Erfahrung und Expertise der jeweiligen Histologen ist daher entscheidend. Zudem sind die Endpunkte häufig unterschiedlich, gleiche Endpunkte werden unterschiedlich interpretiert. In vielen vorliegenden Studien werden dennoch (unterschiedliche) histologische Endpunkte als ähnlich empfindlich wie oder sogar empfindlicher als die empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkte eingeschätzt.

***Statistische Empfindlichkeit***

Die Endpunktempfindlichkeit hängt weiterhin von der statistischen Schärfe der gewonnenen Daten ab. Hier ist bei den populationsrelevanten Endpunkten die Befruchtungsrates (ermittelt durch die Feststellung fehlender Teilungsstadien innerhalb weniger Stunden nach der Eiablage) der mit Abstand trennschärfste Parameter mit einer relativen Standardabweichung von  $\leq 5\%$  sowohl für die Mittelwerte der Raten an Zähltagen innerhalb einer Gruppe, als auch für die Mittelwerte der Mittel der Kontrollreplikate (eigene Daten, s. Anhang). Da die Befruchtungsrates für ÖR-Interaktionen indikativ ist und gleichzeitig den empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt stellt (s. auch (Young et al., 2002)), sollte sie obligatorisch am Binokular bestimmt werden. Es folgen die deutlich unschärferen Parameter Wachstum, Geschlechterverhältnis und Eizahl, deren Varianz auch von der Erhebungsmethodik und der verwendeten Fischart (s.u.) abhängt.

Bei den indikativen Endpunkten ist die VTG-Konzentration zwar mit großer Variabilität behaftet, aber schlägt im Falle einer Induktion in einem Maße aus, das sie dennoch statistisch scharf erscheinen lässt. Dies ist bei geringeren Effektgrößen schwieriger. So gilt bei den für mehrere Wirkmechanismen wichtigen Reduktionen von Biomarkerkonzentrationen, wie auch für die Entwicklung von Hormonkonzentrationen allgemein (z.B. 11-kT), dass die Zahl der untersuchten Tiere ausreichend groß sein muss, um bei der gegebenen Variabilität die geringen effektbedingten Ausschläge statistisch absichern zu können. Hier sollten für regulative Zwecke, etwa in FSAs, pro Konzentrationsstufe nicht weniger als 10 Tiere eines Geschlechts untersucht werden.

Crane und Matthiessen (2007) empfehlen "it seems likely from the analyses performed by Green and Springer (2005) that variability within individual replicates will usually be lower than variability between replicates. Under these circumstances increasing the number of replicates would increase test power". Ein vertretbarer Aufwand wird für Zebrabärblinge bei vier Konzentrationen plus Kontrolle in vier Replikaten gesehen. Eine fünfte Konzentration ist denkbar.

### ***Physiologische Empfindlichkeit***

Der Mechanismus der Sexualdifferenzierung unterscheidet sich zwischen verschiedenen Fischarten und kann zu unterschiedlichen Manifestationen von Wirkungen führen (s.u.).

Insgesamt ist auffällig, dass unter Berücksichtigung der bereits genannten Sachverhalte die Empfindlichkeiten für alle populationsrelevanten Endpunkte in FLCTs relativ nahe beieinander liegen, und zwar bei Rezeptor-Interaktionen ebenso wie bei Enzymhemmungen. Das liegt natürlich auch an der engen Interaktion zwischen den betroffenen Lebensleistungen. So hängen Einflüsse auf die Sexualentwicklung, juveniles Wachstum und Zeitraum bis zur ersten Eiablage eng zusammen; je nach Methode der Bewertung von Reproduktionsdaten ist auch die Eizahl betroffen. Bei starken Geschlechtsverschiebungen ist die Interaktion zwischen Männchen und Weibchen und damit Balz und Eiablage direkt betroffen. Größere Unabhängigkeit kann wohl nur Endpunkten zur Ei- und Spermienqualität wie der Befruchtungsrate oder der Überlebensfähigkeit der Filialgeneration über die Dotterausstattung der Eier eingeräumt werden.

### ***Nachhaltigkeit von Wirkungen***

Eine Bewertung der Nachhaltigkeit von Wirkungen ist nur auf Basis von FLCT-Daten möglich, die nicht unter Dauerbelastung durchgeführt wurden. Hier können Studien herangezogen werden, die entweder mit unterschiedlichen Belastungsfenstern (EE2) oder mit Peak-Exposition (DMI-Fungizide) gefahren wurden.

Die Wirkungen auf populationsrelevante Endpunkte unterscheiden sich hinsichtlich der Nachhaltigkeit ihrer Ausprägung. Aufsteigend nimmt die Nachhaltigkeit zu bei den Endpunkten Balz, Eizahl, Wachstum und Geschlechterverhältnis. Da bei sinkender Konzentration sich wegen der Dauer involvierter physiologischer Prozesse zuerst die Reproduktion erholt und dann das Wachstum aufzuschließen in der Lage ist, während eine Rückentwicklung eines einmal induzierten Geschlechts in der untersuchten Fischart Zebraabräbling nicht möglich scheint.

So verursacht eine Belastung während der Phase der Geschlechtsentwicklung nicht nur die empfindlichste, sondern auch die nachhaltigste Wirkung, während Wirkungen, die während der Reproduktionsphase gesetzt werden, sich vollständig wiedererholen.

***Maternale Effekte***

Ein maternaler Transfer von Effekten ist in verschiedenen Risikobetrachtungen von Bedeutung. Zum einen können Wirkungen auf Elterntiere sich in der nächsten Generation niederschlagen, auch wenn diese nicht oder weniger belastet ist. Dies betrifft vor allem die Eiqualität und ist relevant für die Bewertung von Spitzenbelastungen, wie sie bei der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln erzeugt werden. Zum anderen wird befürchtet, dass sich Wirkungen von Dauerbelastungen in der nächsten Generation verstärken können, was für die Bewertung permanenter Gewässerbelastungen, etwa über Kläranlagenabläufe, wichtig ist. Streng genommen müssten geeignete Daten für die beiden Risikobetrachtungen in Testverfahren mit unterschiedlicher Exposition (Peak-Belastung versus Dauerbelastung) untersucht werden.

Maternale Effekte können nur von primären Effekten unterschieden werden, wenn entweder ein Vergleich belasteter Lebensstadien mit und ohne Belastung der Elterngeneration möglich ist (2-Generationen-Test : FLCT), oder nur die Elterngeneration belastet wurde (z.B. FLCT mit Peak-Belastung). Aus Peak-Expositionstests mit Aromatasehemmern gibt es klare Hinweise auf eine schlechtere Ausstattung der Eier mit Dotter (geringere Größen der ELS), was konsistent zur verringerten VTG-Konzentration im Blut der produzierenden Weibchen war. Allerdings konnten diese Auswirkungen bei ausreichendem Futter im Laufe der juvenilen Wachstumsphase kompensiert werden. Die ökologische Relevanz derartiger Effekte hängt also von der Nahrungssituation im jeweiligen Habitat ab. Die Realität ist sicherlich näher am Wasser-Sediment-System als an einem täglich gesäuberten Durchflusssystem, in dem mit suboptimalem Futter gefüttert wird.

Transgenerationale Effekte bei Dauerexposition können nur in Mehr-Generationen-Tests, mindestens in einem Zwei-Generationen-Test erfasst werden. Der Beweis der Relevanz maternalen Effekttfers steht noch aus, da es bislang nicht genügend vergleichbar erhobene Daten aus FLCT und Zwei-Generationen-Test gibt. Daten aus Zwei-Generationen-Tests können auch nicht ausgekoppelt als FLCT-Daten ausgewertet werden, da ein FLCT mit Eiern unbelasteter Eltern gestartet wird.

**Frage 3: Lassen sich für spezifische sexual-endokrine Wirkmechanismen Regelmäßigkeiten für eine abgestufte unterschiedliche Empfindlichkeit der gängigen Testspezies erkennen?*****Physiologische Empfindlichkeit***

Grundsätzlich zeigen alle verwendeten Fischarten ähnliche Empfindlichkeit. Dies konnte insbesondere am Beispiel der Östrogenrezeptor-Agonisten illustriert werden. Unterschiede zeigen sich bei der Geschlechtsdetermination. Beim Japanischen Reiskärpfling (Medaka) wird das Geschlecht bereits sehr früh festgelegt. Das genetische Geschlecht ist zudem durch vorliegende Geschlechtschromosomen eindeutig bestimmbar. Bei Dickkopfelnritze und Zebrabärbling erfolgt die Geschlechtsdetermination im Juvenilstadium. Für beide Spezies sind die genetischen Geschlechtsmarker auf verschiedenen Chromosomen verteilt und noch unbekannt. Durch östrogene Belastung wird bei Dickkopfelnritze und Medaka eine Verweiblichung hervorgerufen. Beim Zebrabärbling, dessen Männchen sich durch eine Umformung der protogynen Gonade in Testes entwickeln, bewirken Östrogene eine Verzögerung der männlichen Entwicklung, da die Tiere das protogyne Gonaden-Stadium nur langsam oder gar nicht verlassen können. Andererseits bewirken Androgene oder Östrogen-Reduktion in juvenilen Zebrabärblingen, dass das Steroid-Verhältnis auf die männliche Seite verschoben wird und die Umformung der protogynen Gonade in Testes auch in potenziellen Weibchen erfolgt.

Für die Empfindlichkeit des Endpunktes „Geschlechterverhältnis“ bedeutet dies, dass bei östrogen wirksamen Substanzen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Fischarten auftreten, wenn bei Zebrabärblingen die unreifen Männchen gesondert betrachtet werden (in vielen Arbeiten werden sie nicht von Weibchen unterschieden). Bei einer Aromatase-Hemmung scheint der Zebrabärbling sensitiver zu reagieren als die Dickkopfelnritze, die offensichtlich über ein größeres Kompensationspotenzial durch Gegenregulation verfügt.

Es gibt Hinweise, dass Medaka über ein höheres Detoxifikationspotenzial verfügt als die beiden Cypriniden Zebrabärbling und Dickkopfelnritze, was den Reiskärpfling in Einzelfällen unempfindlicher macht.

Sexual-endokrine Wirkungen folgen primär einer monotonen Konzentrations-Wirkungsbeziehung. Diese ist für die verschiedenen Fischarten durchaus

vergleichbar. Die Effektausprägung kann aber letztendlich verschiedene Endpunkte betreffen. Der monotone Charakter von Konzentrations- und Wirkungsbezug kann sekundär von Kompensationsreaktionen überlagert werden, hervorgerufen durch die Gegenregulierung von Syntheseenzymen. Das Potenzial zur Kompensation von Belastungen des sexual-endokrinen Systems ist fischartspezifisch unterschiedlich ausgeprägt aber bis zu einem gewissen Grad begrenzt. Die Verteilung der Kompensationsmöglichkeiten in der heimischen Fischfauna ist bisher nicht systematisch untersucht. Deshalb kann über die Repräsentativität der Testfischarten für die heimische Fauna keine Aussage getroffen werden.

### ***Statistische Empfindlichkeit***

Ein grundsätzlicher Vergleich zwischen den Fischarten bezüglich der statistischen Schärfe betrachteter Endpunkte kann nur unter Vorbehalt erfolgen, da die vorliegenden Tests in den seltensten Fällen wirklich vergleichbar bezüglich Erhebungsmethodik, Erhebungszeitpunkt und -dauer oder Erfahrung im Umgang mit der jeweiligen Fischart sind (Einschätzung in Übereinstimmung mit Crane und Matthiessen 2007).

Die Dickkopfelritze scheint durch ihr größeres absolutes Wachstum eine diesbezüglich statistisch schärfere Aussage zu ermöglichen. Bei Reproduktionsparametern liefert wiederum der Zebrabärbling durch die größere Menge und Homogenität der Eiproduktion statistisch schärfere Ergebnisse. Medaka sollte sich zwischen diesen beiden Polen bewegen.

### **Frage 4: Lassen sich Parameter in der Testdurchführung oder statistischen Auswertung erkennen, die Zahlenwerte und/oder Zuverlässigkeit gemessener Werte besonders beeinflussen können?**

Standardmäßig werden Effektschwellen mit LOEC/NOEC Ermittlung erfasst. Zusätzlich bietet sich die Probit-Statistik anhand von ECx Werten an. Diese Anwendung ist grundsätzlich für die erhobenen Endpunkte aus FSA und FLCT möglich und liefert zusätzliche Aussagekraft. Insbesondere für die Auswertung von Biomarker Antworten ist die ECx Betrachtung geeignet. Mit Hilfe von gesetzten Bewertungsgrenzen (z. B. Kontrollmittelwert plus die doppelte Standardabweichung) kann die Anzahl der Individuen jenseits dieser Grenzen bestimmt werden. Dadurch sind nicht länger Konzentrationsangaben etwa von VTG Gegenstand der Auswertung, sondern



Prozentwerte. Damit ist die Möglichkeit einer Wirkung von 0 bis 100% definiert und mit einer Probit-Statistik zu bearbeiten.

Für die empfindlichen Endpunkte Wachstum und Reproduktion lassen sich Forderungen formulieren, die eine statistische Schärfung der ermittelten Daten ermöglichen:

Statistische Vorteile für den Parameter Wachstum ergeben sich mit steigender absoluter Größenzunahme und mit zunehmender Homogenität zwischen den Individuen. Für den Endpunkt Reproduktion nimmt die Datenschärfe mit steigender Eizahl pro Weibchen und Tag zu. Die Aussageschärfe dieses Endpunktes kann durch tägliche Erfassung noch gesteigert werden. Auch bei der Reproduktion kann Gleichheit im Verhalten der untersuchten Fischart Variationen im Gesamtbild verringern.

Unter den Reproduktionsparametern liefert die Befruchtungsrate eine Aussage mit hoher statistischer Schärfe. Insbesondere bei den Östrogenrezeptor-Agonisten zeigt sie hohe Empfindlichkeit und geringe Schwankungen zwischen den Einzelreplikaten. Aufgrund dieser Vorteile sollte sie in jedem Fall bestimmt werden. Die Bestimmung sollte anhand der jungen Ei-Stadien erfolgen.

Die Konsistenz von Reproduktionsdaten in Form von Eizahlen lässt sich gewährleisten, indem täglich eine Bestimmung erfolgt. Beim Zebrabärbling hat sich die Gruppenhaltung als vorteilhaft erwiesen.

Um Effekte auf das Geschlechterverhältnis sicher erfassen zu können, darf im FLCT vor der Bestimmung keine gezielte Selektion der Tiere nach Geschlecht stattfinden. Eine Reduzierung der Gruppengröße während des Tests auf gleich große Gruppengrößen ist notwendig, um die sich entwickelnde Biomasse dem Testsystem anzupassen, die Fischdichte nicht zu hoch werden zu lassen und eine Vergleichbarkeit von Daten zur Entwicklung zu gewährleisten. Die Reduktion sollte immer randomisiert erfolgen. Ist die Erstellung von Laichgruppen im Versuchsverlauf vorgesehen, bietet sich alternativ, die ausgesonderten Tiere getrennt weiter zu belasten und im weiteren Verlauf eine Geschlechtsbestimmung vorzunehmen.

Die Bestimmung des Eidottervorläufer-Proteins VTG mit proteinbiochemischen Methoden erfolgt in Blutproben. Kleine Laborfische mit kleinen Blutvolumina sind bei der Blutentnahme methodisch anspruchsvoll und bedingen die Gefahr systematischer Fehler und hoher Varianz. Eine Möglichkeit diese zu reduzieren, bietet der Bezug auf die Menge an Gesamtprotein in den Blutproben.

Die Verwendung von historischen Kontrolldaten kann zusätzliche Informationen liefern und die Interpretation von Effekten erleichtern. In diesem Sinne bietet das im Anhang beigefügte Dokument „Zebrafish Full Life Cycle Tests: Unaffected Fish Data“ einen Überblick über die replikatbezogene Variabilität der Endpunkte ELS-Überlebensrate, Eiproduktion, Befruchtungsrate, Geschlechterverhältnis und VTG-Gehalt der am IME durchgeführten Tests bis September 2004.

Die diesem Dokument zugrunde liegenden Daten gehen auch in eine vergleichende Auswertung der Endpunkt-Variabilitäten und statistischen Aussageschärfe von FLCTs ein, die von der Consultant-Agentur Watts and Crane Associates im Auftrag der OECD durchgeführt wird ((Crane and Matthiessen, 2007)). Dort gehen auch Daten von Tests mit Dickkopfritzen und Reiskärpflingen ein. Neben den OECD-Aktivitäten wurde ein CEFIC-Projekt aufgelegt, welches neben anderen Aspekten auch die natürliche Variabilität und Aussagekraft populationsrelevanter Endpunkte zum Thema hat. So ist innerhalb der nächsten zwei Jahre mit einer deutlichen Verbesserung der allgemein verfügbaren diesbezüglichen Datenlage zu rechnen.

## 5 Literatur

- Boettcher, M., Teigeler, M., Schaefers, C. and Braunbeck, T. (2007): Effects of endocrine active substances on populations of the zebrafish (*Danio rerio*). Poster Presentation at the 17th Annual Meeting of SETAC Europe, Porto, 20-24 May, 2007.
- Crane, M. and Matthiessen, P. (2007): An evaluation of the reproducibility and power of various endpoints in Partial and Fish Full Life Cycle Tests. OECD Report JA00043729, pp 88.
- Ensenbach, U. (1991): Kinetik und Dynamik von Fremdstoffgemischen beim Zebraabräbling (*Brachydanio rerio*). Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Fenske, M., Maack, G., Schafers, C. and Segner, H. (2005): An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environ Toxicol Chem* 24, 1088-98.
- Fenske, M. and Segner, H. (2004): Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 67, 105-26.
- Holbech, H., Kinnberg, K., Petersen, G. I., Jackson, P., Hylland, K., Norrgren, L. and Bjerregaard, P. (2006): Detection of endocrine disruptors: evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144, 57-66.
- Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G. I. and Bjerregaard, P. (2007): Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145, 165-70.
- Lange, R., Hutchinson, T. H., Croudace, C. P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G. H. and Sumpter, J. P. (2001): Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20, 1216-27.
- McKim, J. M. (1977): Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J. Fish Res. Bd. Can.* 34, 1148-1154.
- Mount, D. I. (1980): An evaluation of the ability of early life stage tests to predict chronic toxicity as measured in life cycle tests. US Environmental Protection Agency, internal report, 25pp.
- Nagel, R., Luwichowski, K. U., Oetken, M., Schmidt, J., Jackson, P., Petersen, G., Meller, M., Eberling, M., Tomcyk, S., Schallnass, H. J., Knacker, T., Boshof, U., Teigeler, M., Schaefers, C., Schwaiger, J. and Triebkorn, R. (2004): Ringtest zur Validierung der Prüfrichtlinie Fish Life-Cycle Test mit dem Zebraabräbling (*Danio rerio*). Forschungsbericht FKZ 200 67 411, Umweltbundesamt Berlin, 141 S.
- Parrott, J. L. and Blunt, B. R. (2005): Life-Cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environ Toxicol* 20, 131-141.
- Schaefers, C. (2007): Abschätzung der Sicherheit einer Extrapolation von Wachstumsdaten aus Early Life Stage und Juvenile Growth Tests (OECD 210, 204, 215) auf die NOEC von Fish Full Life Cycle Tests bei der Risikobewertung von DMI-Fungiziden. Stellungnahme erarbeitet für den Industrieverband Agrar, 01.10.2007, 16 S.

- Schaefers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M. and Segner, H. (2007): Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*. *J Toxicol Environ Health A* 70, 768-79.
- Scholz, S. and Gutzeit, H. O. (2000): 17-a-ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 50, 363-373.
- Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C. R., Maack, G., Pascoe, D., Schaefers, C., Vandenberg, G. F., Watts, M. and Wenzel, A. (2003): Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol Environ Saf* 54, 302-14.
- Seki, M., Yokota, H., Maeda, M. and Kobayashi, K. (2005): Fish full life-cycle testing for 17beta-estradiol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 24, 1259-66.
- Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H. and Kobayashi, K. (2004): Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 23, 774-81.
- Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H. and Kobayashi, K. (2003): Fish full life-cycle testing for the weak estrogen 4-tert-pentylphenol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 22, 1487-96.
- Sheahan, D. A., Bucke, D., Matthiessen, P., Sumpter, J. P., Kirby, M. F., Neall, P. and Waldock, M. (1994): The effects of low levels of 17 alpha ethynylestradiol upon plasma vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, held at two acclimation temperatures. published in: Müller, R. ; Lloyd, R. (eds) *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Fishing News Books, Blackwell Science Ltd., Oxford, Great Britain, 99-112.
- Sohoni, P., Tyler, C. R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M. and Sumpter, J. P. (2001): Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 35, 2917-25.
- van der Ven, L. T., van den Brandhof, E. J., Vos, J. H. and Wester, P. W. (2007): Effects of the estrogen agonist 17beta-estradiol and antagonist tamoxifen in a partial life-cycle assay with zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 26, 92-9.
- Wenzel, A. and Schaefers, C. (2001): Research efforts towards the development and validation of a test method for the identification of endocrine disrupting chemicals. *Forschungsbericht EU DG* 24, B6-7920/98/000015
- Williams, T. D., Caunter, J. E., Lillicrap, A. D., Hutchinson, T. H., Gillings, E. G. and Duffell, S. (2007): Evaluation of the reproductive effects of tamoxifen citrate in partial and full life-cycle studies using fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 26, 695-707.
- Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T. and Kobayashi, K. (2001): Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 20, 2552-60.
- Young, W. P., Whitehouse, I., Johnson and Brighty, G. (2002): Steroid estrogens: Environmental thresholds for the protection of freshwater life. *WRC-NSF R&D Technical Report P2-T04/1*

## 6 Anhänge

Anhang 1: Endpunktbezogene Daten für Replikate von Kontrollansätzen und nicht betroffenen Konzentrationen zur Abschätzung der Endpunktvariabilität der Zebrabärbling-Stamms des Fh-IME (Angefertigt für die OECD Fish Drafting Group, in Englisch)

Anhang 2: Tabelle Verwendete Studien aus der Literatur

Anhang 3: Protokoll des Fachgesprächs am Umweltbundesamt

***Anhang 1: Endpunktvariabilität in FLCT mit dem Zebra­bärbling-  
Stamm des Fh-IME***

**Zebrafish Full Life Cycle Tests: Unaffected Fish Data**

Authors:

Christoph Schäfers, Matthias Teigeler

Fraunhofer Institute for Molecular Biology  
and Applied Ecology,

P.O. Box 1260

57377 Schmallenberg, Germany

September 07, 2004

## Introduction

Zebrafish is a test species commonly used in European chemical evaluation. The required tests are mainly restricted to acute and prolonged toxicity tests. More advanced studies like juvenile growth tests, early life stage tests or life cycle tests are rare, especially when regarding GLP studies.

Within the OECD discussions of a fish full life cycle or two generation test, zebrafish is one of three species in the main focus. Since pesticide testing was dominated by the American needs in the last decades, early life stage and juvenile growth tests have been performed mainly with rainbow trout and Fathead Minnow. Thus, information is scarce on data variability concerning the endpoints of a zebrafish two generation study.

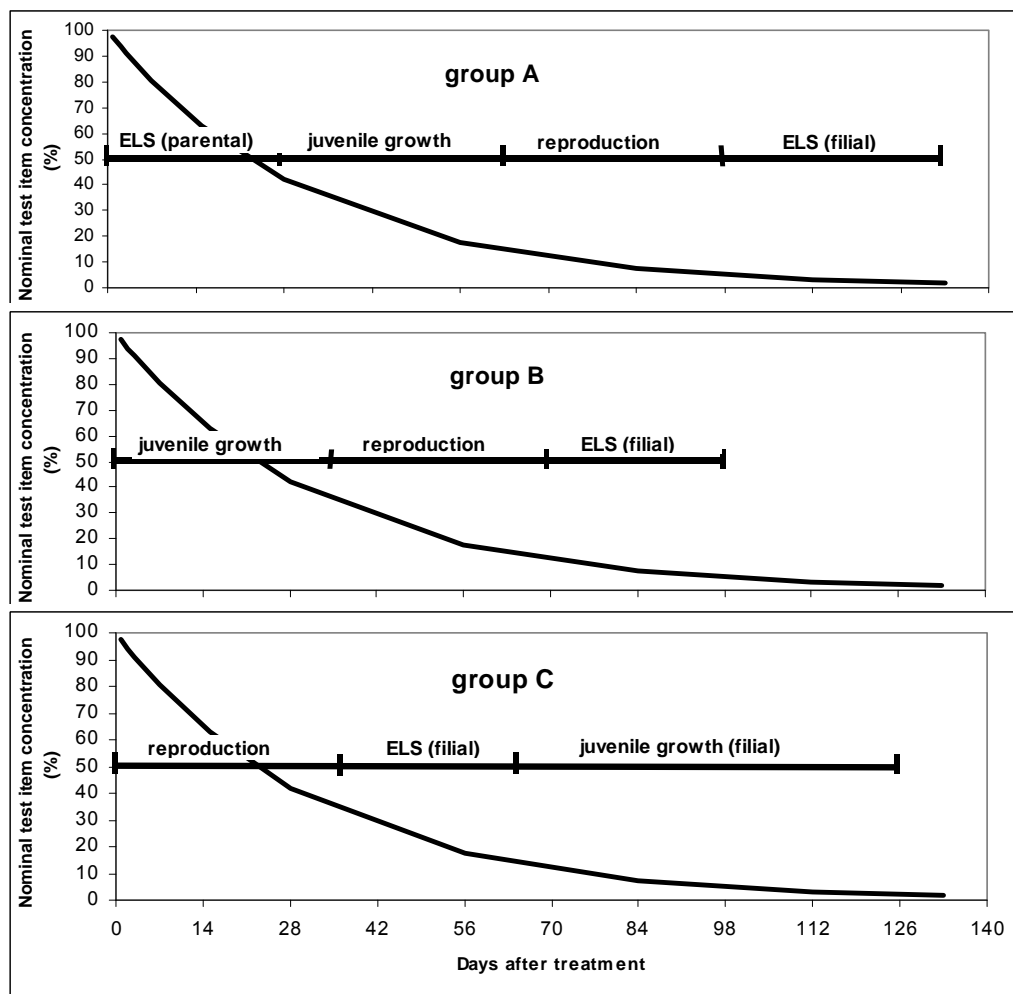
During the last five years, our laboratory at Fraunhofer IME conducted several zebrafish full life cycle studies with different objectives and study designs. Most data were generated in confidential GLP studies. After discussion with the sponsors, the anonymized non-effect data can be used for a statistical evaluation of data variability and presented to the public.

## Included Tests

The comparison (comprising all studies at the IME since 1998) includes three main test types of zebrafish full life cycles tests:

1. Flow-through tests with four or five treatments and a control in two replicates each (100 fertilized eggs per replicate, reduced to 50 juveniles and 24 to 30 spawners; group exposure). The fish were continuously exposed to the test item for the period from the fertilized egg to reproduction, an exposure of at least the early life stages of the following generation was included. Tests with p-tert-Octylphenol and 17 $\alpha$  Ethinylestradiol (EE2) were conducted for two EU projects (non-GLP), EE2 tested for two generations (the filial generation also reproduced). A further EE2 study was performed to clarify the effect of different exposure durations.  
One study with NeemAzal, a pesticide product, was performed according to GLP and incompletely published by the sponsor.  
To enlarge the data set for early life stage (ELS) survival, three confidential ELS studies (GLP) were included.  
For the evaluation of vitellogenin concentrations, data of two atrazine full life cycle tests (by Nagel, TU Dresden, and Knacker, Flörsheim) are included. They are part of a ring test, the VTG measurements were conducted by the IME.  
The most recent flow-through test was a two-generation test according to GLP with a persistent pesticide metabolite. It comprised three treatments plus control in 4 replicates each.
2. Semi-static tests with four or five treatments and a control in two replicates each (100 fertilized eggs per replicate, reduced to 50 juveniles and 24 to 30 spawners; group exposure). The fish were exposed to initial concentrations of the test item three times a week, from the fertilized egg to reproduction, an exposure of the early life stages of the following generation was included. The tests were conducted for two EU projects (non-GLP), the chemicals tested were Bisphenol A and Genistein. From the flow-through study with EE2, after different times fish were transferred to untreated water (exchange: 3 times a week) and reared until reproduction.

3. Static tests with three to five concentrations in two or three replicates and four or three controls (all GLP). The studies were designed to reduce uncertainties concerning pesticide long-term effects of realistic exposure which are relevant for fish populations (e.g. endocrine disruption or high bioaccumulation). Realistic exposure (realistic initial concentrations, followed by realistic dissipation of the test substance from the water column) can most easily be simulated when including sediment and performing static exposure rather than designing flow-through conditions as usual. In order to enable as much standardization as possible, artificial sediment was used. Because the life stage at test start, which is exposed to initially high concentrations, may not be representative for all fish life stages being at risk, three different life stages (fertilized eggs, juveniles, adults at the beginning of reproduction) were exposed at the same time and all reared until reproduction with a consecutive observation of the filial early life stages (Figure 1). Each replicate consisted of a 300 L-aquarium divided in three compartments by stainless steel nets, one for group A (introduced as 100 fertilized eggs), one for group B (introduced as 50 28 d old juveniles), and one for group C (introduced as 30 pre-spawning fish of 60-70d). After 28 days, group A fish were reduced to 50. After 60-70 days of age, group A and B fish were reduced to 30.



**Figure 1: Exposure of the different life stages run through and performances by fish of groups A, B and C**



***Included data***

All tests were started with 100 fertilized eggs per replicate. The data included in this comparison are related to individual replicates. They focus on early life stage survival (total success) and reproduction as mean eggs per female per day and fertilization rate. The reproduction data are based on approximately 20 successive daily counts per test. Since the fish were sexed by gonad inspection at the end of the study, the egg counts were normalized for female numbers. For tests with a randomized selection of fish at the reduction events, sex-ratios are also evaluated. For a limited number of tests, vitellogenin concentration in the blood plasma of adult fish (males and females) were also measured and are included. The concentrations were determined by ELISA techniques, either by Fenske (EU project on endocrine disruption) or by Biosense zebrafish VTG ELISA kits (GLP project, atrazine ring test). The data are related to total protein concentrations in the plasma.

The data set includes all control replicates and the treated replicates without effect of the test item. In the few situations where study conditions were clearly responsible for enhanced data variability (loss of spawned eggs by competing spawning substrate, reduced hatch due to influence of aquatic insects in the sediment, sex ratio biased by non randomized reduction of fish), data were omitted from the comparison.

## Data Presentation

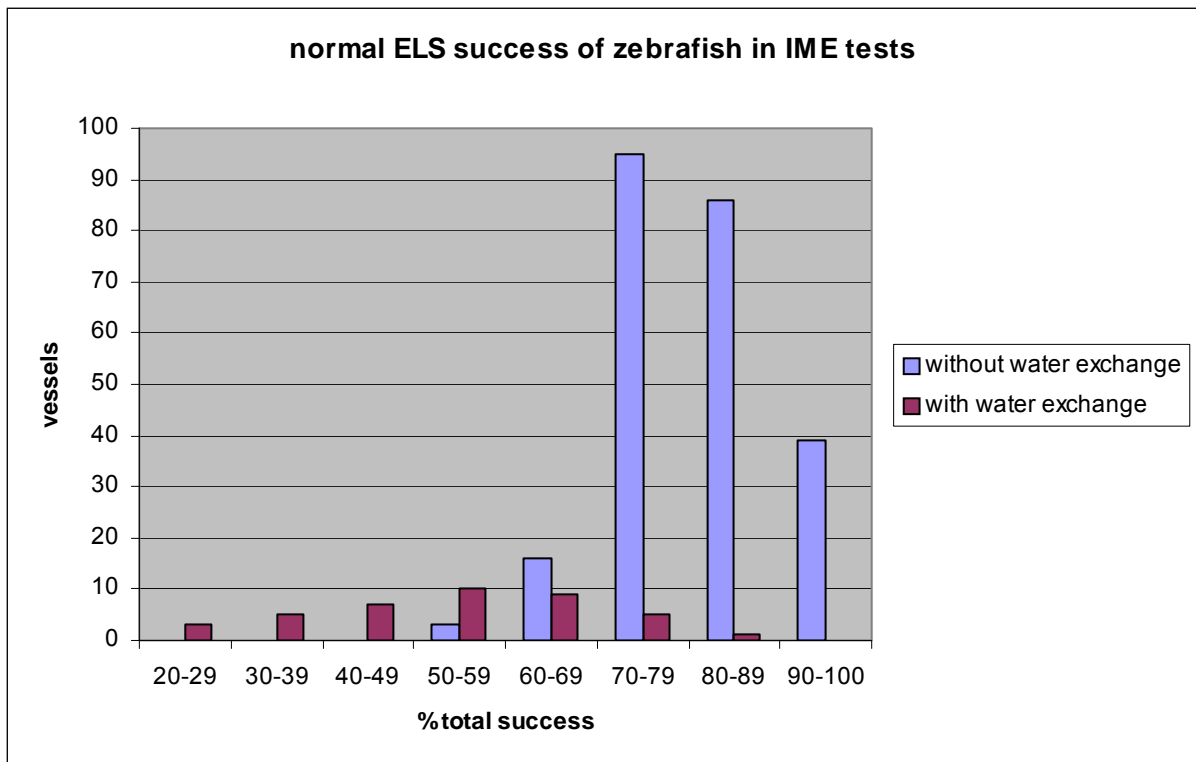
### **Early life stage total success**

When regarding ELS total success, the means and variances of flow-through and static tests were comparable and the data sets could be combined to a group „no water exchange event“ (table 1, figure 2). The mean of 80 % survival represents approximately 19000 individuals. The quality criterion of the OECD 210 of 70% mean control post-hatch success was met by all 23 data sets except one (non-GLP). The 8% of replicates below 70% total success were close to it, with the lowest value at 50%.

Table 1: Statistics of ELS survival in FLC and ELS tests with zebrafish at the IME

	no water exchange	water exchange (3/w)
ELS phases (n)	23 (18 GLP)	4 (all non-GLP)
Replicates included (n)	239	40
Mean survival rate, end ELS (%)	80.3	54.0
Sd (%)	8.8	14.5
Rel. sd (%)	11.0	85.0
Min (%)	50	26
Max (%)	100	81
n<70%	19	34
n<70% (% of total n)	7.9	85

The group „water exchange“, representing the semi-static tests (all non-GLP) showed clearly worse results with a lower mean and higher variability. This is most probably due to a combination of frequent disturbance and less experienced staff.



**Figure 2: Zebrafish ELS total success classes of IME test replicates.**

**Reproduction: Total eggs per female and day**

When regarding total eggs spawned per female and day, the means and variances of flow-through and static tests were comparable irrespective of the kind of exposure or the experience of the staff.

Table 2: Statistics of eggs per female per day in zebrafish FLC tests at the IME

Reproduction phases (n)	21 (12 GLP)
Replicates included (n)	205
Mean eggs per female per day (n)	37.2
Sd	16.1
Rel. sd (%)	43.2
Min (n)	10.2
Max (n)	104.9
n<20	13
n<20 (% of total n)	6.3

The data base comprises 205 replicates with approximately 15 females and 20 daily egg counts each, thus about 3000 females and 2.2 million eggs. The mean of 37 eggs per female and day is within a high range of variability (table 2). For 160 replicates (78%), eggs were counted to be between 20 and 50. As quality criterion a mean control egg number per female and day of 20 can be derived. Only 6% of the replicates exhibited egg numbers below 20 (figure 3).

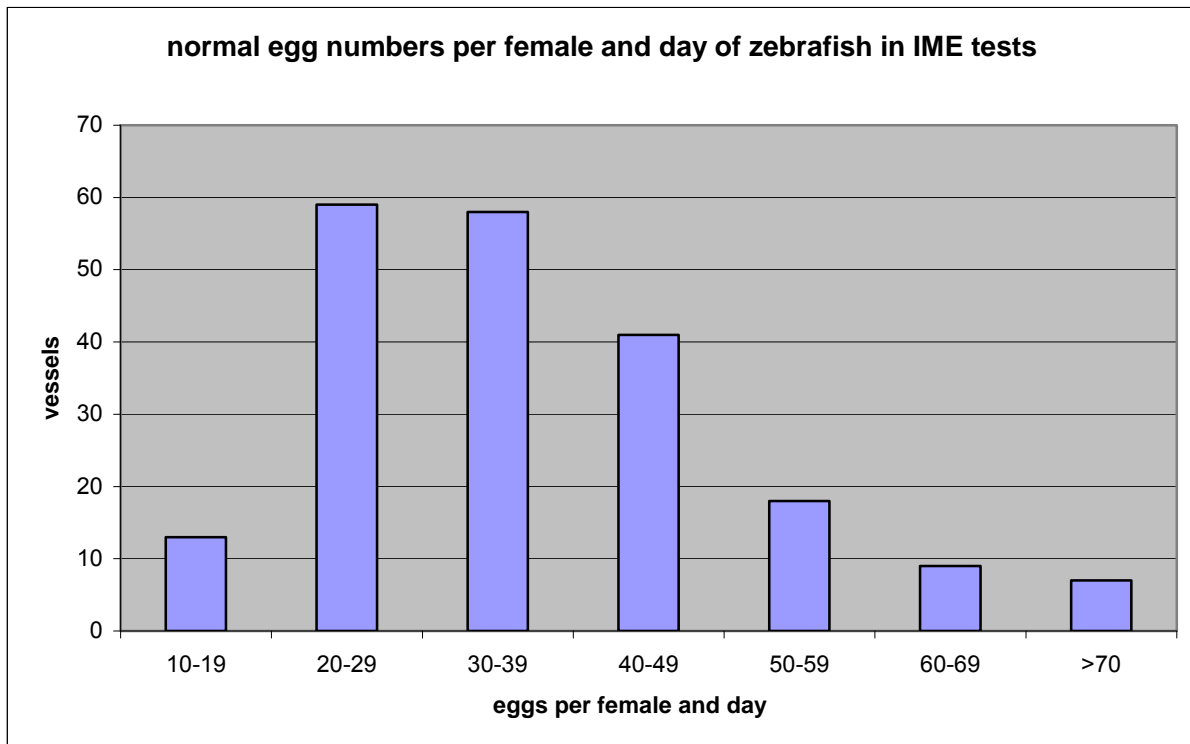


Figure 3: Zebrafish eggs per female and day classes of IME test replicates.

## Reproduction: Fertilization rate

When regarding fertilization rates, the means and variances of flow-through and static tests were comparable and the data sets could be combined to a group „no water exchange event“ (table 3, figure 4). Rates were high (mean of 93 %) with very low variability (relative standard deviation below 5%). The data base comprises approximately 2 million eggs, each individually checked for being fertilized using a binocular within few hours after spawning. As quality criterion a fertilization rate of 85% can be derived. The 2.5% of replicates below 85% fertilization rate were close to it, with the lowest value at 79%.

The group „water exchange“, representing the semi-static tests (all non-GLP) showed clearly worse results with a lower mean and higher variability. This is most probably due to a combination of frequent disturbance and less experienced staff.

Table 3: Statistics of fertilization rates in FLC tests with zebrafish at the IME

	no water exchange	water exchange (3/w)
Reproduction phases (n)	19 (15 GLP)	5 (all non-GLP)
Replicates included (n)	198	34
Mean fertilization rate (%)	93.0	84.1
Sd (%)	3.2	8.9
Rel. sd (%)	3.5	10.5
Min (%)	79.0	60.0
Max (%)	97.5	96.3
n<85%	5	17
n<85% (% of total n)	2.5	50.0

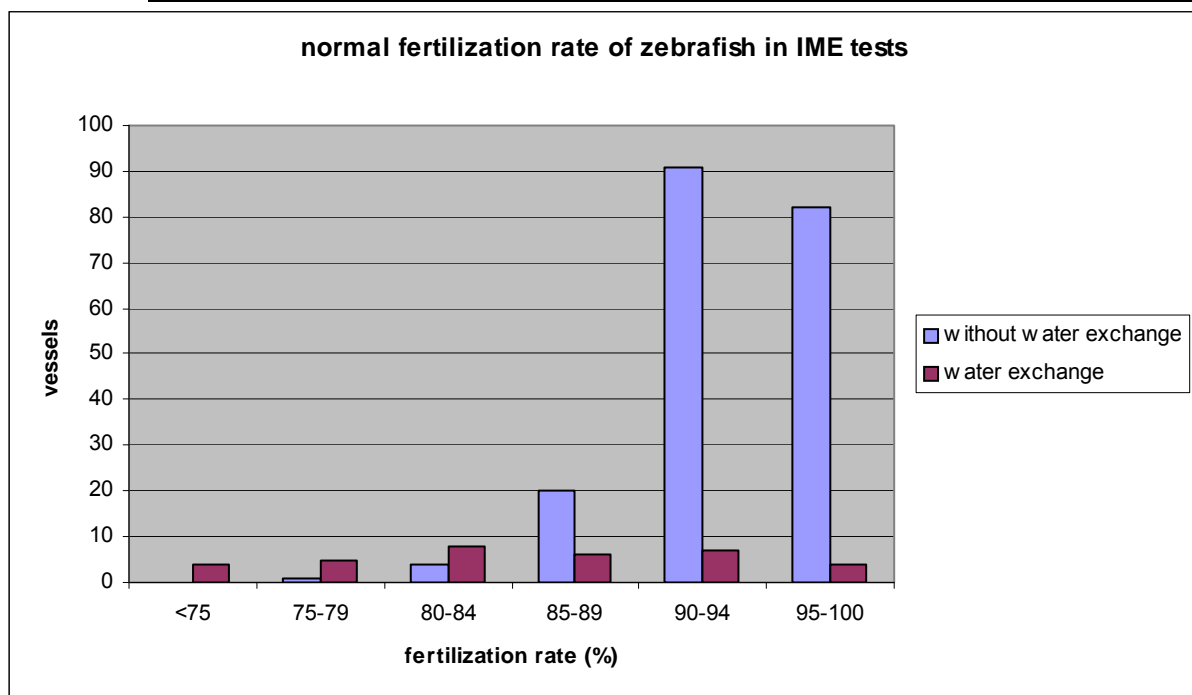


Figure 4: Zebrafish fertilization rate classes of IME test replicates.

## Sex ratio

For the determination of sex ratios, only fully developed gonads were used. The means and variances of flow-through, static and semi-static tests were comparable and the data sets could be combined to one group (table 4, figure 5). The portion of females was around 50% with high variability. The data base comprises approximately 4000 fish (around 30 per replicate), checked for sex by gonad inspection after the observation of reproduction. As quality criterion a sex ratio range of 25-75% can be derived. Below 5 % of the replicates were outside that range. The normal range is 35-65%. For this range, a normal reproduction was shown (figure 6).

Table 4: Statistics of sex ratios (parts of females) in FLC tests with zebrafish at the IME

Reproduction phases (n)	12 (9 GLP)
Replicates included (n)	127
Mean part of females (%)	55.2
Sd (%)	12.4
Rel. sd (%)	22.5
Min (%)	27
Max (%)	90
75%>n<25%	6
75%>n<25% (% of total n)	4.7

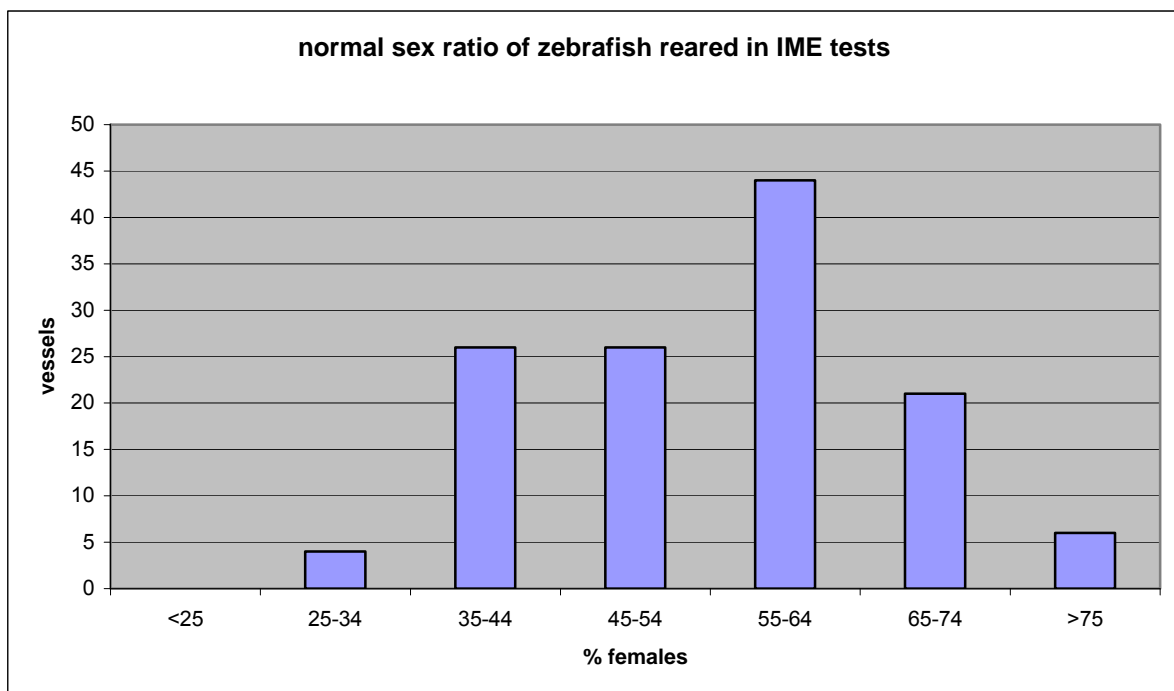


Figure 5: Zebrafish sex ratio classes of IME test replicates.

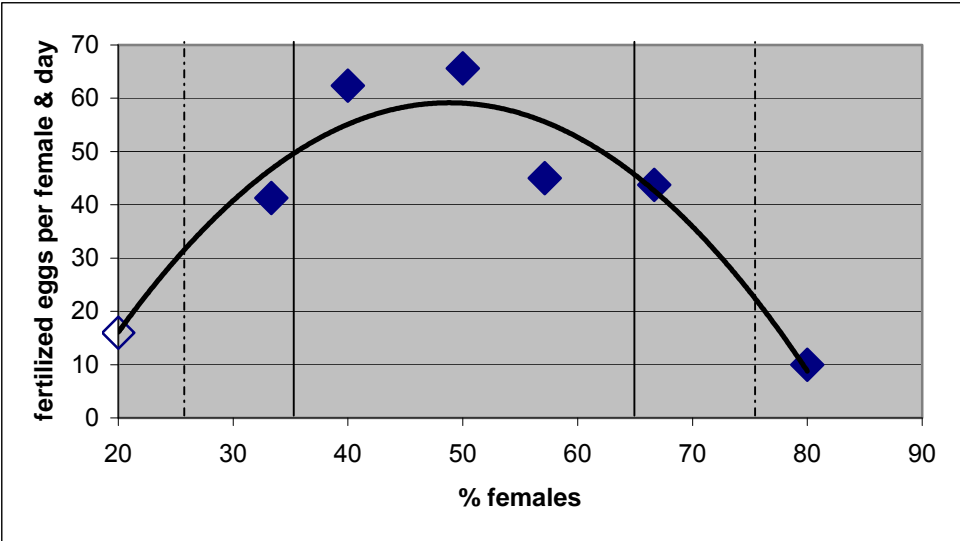


Figure 6: Relation between sex ratio and reproductive success

### ***Vitellogenin concentrations***

For the determination of vitellogenin concentrations, only spawning fish were used. The means and variances of flow-through and static tests were comparable and the data sets could be combined to one group (table 5, figure 6). The VTG concentration in females was around 300 ng/ $\mu$ g protein, varying between 100 and 500 ng/ $\mu$ g (only 4% outside that range). The data base comprises approximately 400 fish, checked for sex by gonad inspection after the observation of reproduction.

In males, a mean VTG concentration of 0.26 ng/ $\mu$ g with very high variability was determined. Figure 6 indicates that there were two groups of tests, one with low VTG levels (around 0.1 ng/ $\mu$ g) and others with the threefold concentrations. Only 8% of the vessels exhibited concentrations outside the range of 0.05-1 ng/ $\mu$ g.

Table 5: Statistics of vitellogenin concentrations (ng/ $\mu$ g protein) in blood plasma of adult zebrafish in FLC tests at the IME

Sex	female	male
Reproduction phases (n)	9 (3 GLP)	8 (2 GLP)
Replicates included (n)	55	48
Mean VTG concentration (ng/ $\mu$ g)	297	0.26
Sd (ng/ $\mu$ g)	104	0.28
Rel. sd (%)	35	107
Min (ng/ $\mu$ g)	135	0.01
Max (ng/ $\mu$ g)	593	1.18
500>n<100 (f); 1>n<0.05 (m)	2	4
outside range (% of total n)	3.6	8.3



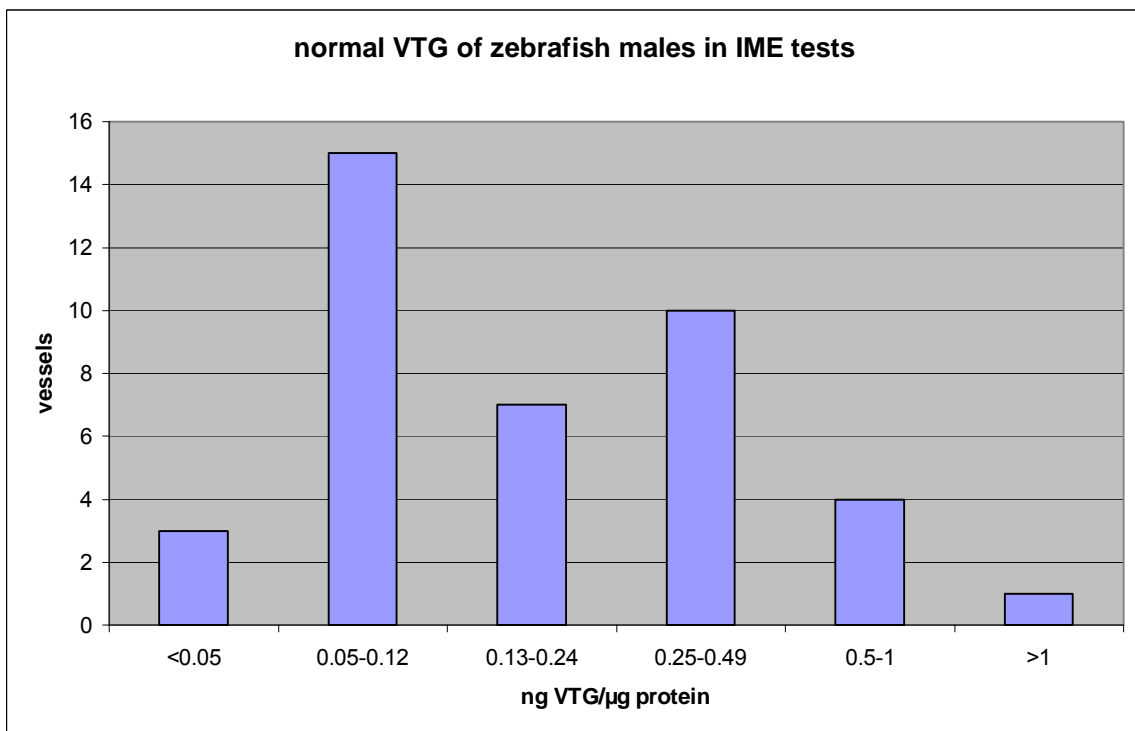
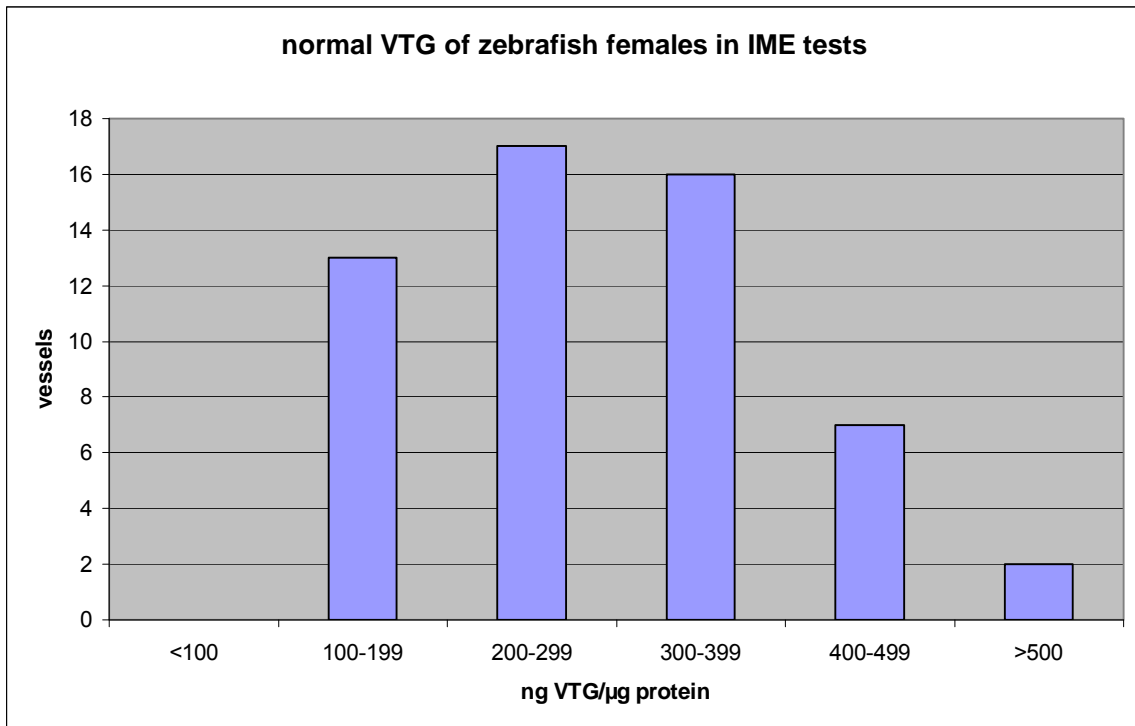


Figure 6: Zebrafish VTG concentration classes of IME test replicates.

## Conclusions

The data is suited to demonstrate the endpoint variability of zebrafish life cycle tests, at least for the laboratory bred strain used.

For early life stage total success of the parental or filial generation, the quality criterion of the OECD 210 is feasible. By using 2 replicates per concentration and four controls, a 25% deviation from controls or a mean below 60% survival is probably statistically significant.

For eggs per female per day, a quality criterion of 20 is suggested. Due to the high variability, at least a 75% deviation from controls is needed to be statistically significant when using 2 replicates per concentration and four controls.

For fertilization rate, a quality criterion of 85% is suggested. Due to the low variability, a 10% deviation from controls (mean below 83% fertilization) is probably statistically significant.

For sex ratio, a normal range of 35-65% is suggested. A deviation of more than 50% from control means (mean below 25% or above 75%) is probably statistically significant when using 2 replicates per concentration and four controls.

Vitellogenin concentrations (related to total protein contents) normally range from 100 to 500 ng/ $\mu$ g in female and from 0.05 to 1 ng/ $\mu$ g in male blood plasma. Male data may depend on test conditions more strongly.

In all, egg numbers are the clearly most variable endpoint.

## Outlook

The data set may be used to extract also statistics for growth and development parameters at different ages, such as length or time to first spawning. Histological data have been generated differently, if included, and thus are not comparable. However, they may be also used as additional information.

## References

Wenzel A, Schäfers C (2001) Research efforts towards the development and validation of a test method for the identification of endocrine disrupting chemicals. Report to EU DG 24, B6-7920/98/000015.

Segner H, Schäfers C, Wenzel A, Janssen C, Pascoe D (2001) Identification of Endocrine Disrupting Effects in Aquatic Organisms (IDEA). Summary Progress Report, Contract No. ENV4-CT97-0509.

Schmitz A, Schäfers C, Troß R, Ruch B, Kleeberg H (2001) Effects of NeemAzal on fish : full life cycle test with the zebrafish, *Danio rerio*. In : Reginerio S, Kleeberg H (eds) Practice oriented results on use and production of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control. Proceedings of the 2. Workshop « Neem & Pheromones » May 15-16, 2001, University of Uberaba, p. 37-50.

ELS GLP studies coded RÖH-027/4-18 (2002), RÖH-028/4-18 (2004), SUM-001/4-18 (2002)

FLC GLP studies CYA-004/4-61 (2001), BAS-014/4-61 (2003), BAS-015/4-61 (2003), BAS-018/4-61 (2004), BAY-20/4-62 (2004)

**Anhang 2: Verwendete Studien aus der Literatur**

Tabelle 7: Zusammenstellung der FLCT Daten. Dargestellt sind die empfindlichsten populationsrelevanten sowie die empfindlichsten indikativen Endpunkte

Substanz	Testart	Konzentrationen (nominal/gemessen)	Verwendeter Testfisch	Empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt	NOEC Population	Empfindlichster Indikativer Endpunkt	NOEC Indikator	Referenz	Bemerkungen
<b>ÖSTROGEN REZEPTOR AGONIST</b>									
Ethinylöstradiol	Zwei Generationen Test	Nominal: 0.05, 0.3, 1.67, 3.0, 10 ng/L Gemessen im Mittel: 0.06, 0.3, 1.1, 3.0, 10 ng/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Befruchtungsrate - Zeitpunkt der ersten Eiablage - Verhinderung des Balzverhaltens (Männchen)	0.3 ng/L	- Induktion von Vitellogenin (Zunahme) - Gonaden- histologie (Veränderungen)	0.3 ng/L	(Segner et al., 2003; Wenzel and Schaefers, 2001) (Fenske et al., 2005) (Schafers et al., 2007)	
Bisphenol A	FLCT	Nominal / initial: 94, 188, 375, 750, 1500 µg/L Gemessen im Mittel: 12, 24, 40, 86, 157 µg/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Befruchtungsrate Zeitpunkt der ersten Eiablage	NOEC: 750 µg/L (initial) EC10: 390 µg/L	- Induktion von Vitellogenin (Zunahme)	188 µg/L (Initial)	(Segner et al., 2003)	
p-tert Octylphenol	FLCT	Nominal: 1.2, 3.2, 12, 38 µg/L Gemessen im Mittel: 1.0, 2.8, 11, 35 µg/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Befruchtungsrate - Zeitpunkt der ersten Eiablage	11 µg/L			(Segner et al., 2003)	VTG nicht untersucht
Genistein	FLCT	Nominal/Initial: 0.48, 1.5, 4.9, 16 µg/L Gemessen im Mittel: 0.45, 1.3, 4.2, 20 µg/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Befruchtungsrate - Zeitpunkt der ersten Eiablage	1.3 µg/L			(Segner et al., 2003)	VTG nicht untersucht
Bisphenol A	FLCT	Nominal: 1; 16; 160; 640; 1280 µg/L	Dickkopfelritze ( <i>Pimephales promelas</i> )	- Schlupfrate (F1-Generation)	160 µg/L	- Gonaden- histologie (Testis) - VTG Induktion (Männchen) - GSI	1 µg/L	(Sohoni et al., 2001)	Befruchtungsrate nicht untersucht

## Fortsetzung der Tabelle 7

Substanz	Testart	Konzentrationen (nominal/gemessen)	Verwendeter Testfisch	Empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt	NOEC Population	Empfindlichster Indikativer Endpunkt	NOEC Indikator	Referenz	Bemerkungen
<b>ÖSTROGEN REZEPTOR AGONIST</b>									
Ethinylöstradiol	FLCT	Nominal: 0.2; 1.0; 4.0; 16; 64 ng/L	Dickkopfritze ( <i>Pimephales promelas</i> )	- Geschlechter- verhältnis (F0-Generation) - Wachstum, (F0-, F1- Generation)	1.0 ng/L	- Gonaden- histologie (Ovotestis) - VTG Induktion	1 ng/L (Ovotestis) 4 ng/L (Vitellogenin)	(Lange et al., 2001)	Befruchtungsrate nicht untersucht
Ethinylöstradiol	FLCT	Nominal: 0.32, 0.96 Gemessen: 3.5; 9.6; 23 ng/L	Dickkopfritze ( <i>Pimephales promelas</i> )	- Befruchtungsrate	<0.32 ng/L	- Sekundäre Geschlechts- merkmale	0.32 ng/L	(Parrott and Blunt, 2005)	
4-tert pentyphenol	FLCT	Nominal: 62.5; 125; 250; 500; 1000 µg/L Gemessen im Mittel: 51.1, 100, 224, 402, 931 µg/L	Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	- Geschlechter- verhältnis, (F0-Generation) - Befruchtungsrate, (F0-Generation)	100 µg/L	- VTG Induktion (Männchen)	< 51.1 µg/L	(Seki et al., 2003)	
17-beta Östradiol	FLCT	Nominal: 0.95, 3.1, 9.8, 31.3, 100 ng/L; gemessen im Mittel: 0.94, 2.9, 8.7, 27.9, 92.4 ng/L	Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	- Befruchtungsrate (Fo-Generation) - juveniles Wachstum (F1-Generation)	2.9 ng/L	- VTG Induktion (Männchen)	2.9 ng/L	(Seki et al., 2005)	
Nonylphenol	FLCT	Nominal: 1.9; 5.56; 16.7; 50; 150 µg/L Gemessen im Mittel: 4.2, 8.2, 17.7, 51.5, 183 µg/L	Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	- Geschlechter- verhältnis (F1-Generation) - Überlebensrate (F0-Generation)	8.2 µg/L	- GSI (F0-Generation)	4.2 ng/L	(Yokota et al., 2001)	

## Fortsetzung der Tabelle 7

Substanz	Testart	Konzentrationen (nominal/gemessen)	Verwendeter Testfisch	Empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt	NOEC Population	Empfindlichster Indikativer Endpunkt	NOEC Indikator	Referenz	Bemerkungen
<b>ÖSTROGEN REZEPTOR ANTAGONIST</b>									
Tamoxifen-Citrat	Zwei Generationen Test	Nominal: 0.16; 0.5; 1.6; 5.0; 16 µg/L	Zebrabärbling (Danio rerio)	- Befruchtungsrate, (F0-Generation)	1.6 µg/L	- VTG Reduktion (F0-Generation, Weibchen) - 11-keto- Testosteron	1.6 µg/L	Eigene Daten Fraunhofer IME	
Tamoxifen	PLCT	Nominal: 3.2; 10; 32; 100; 320 µg/L	Zebrabärbling (Danio rerio)	- Schlupfrate, (F1-Generation) - Wachstum, (F1-Generation)	10 µg/L	- Gonadenhistologie (F0-Generation, Leydig-Zellzahl) - VTG Reduktion (F0-Generation)	32 µg/L	(van der Ven et al., 2007)	
Tamoxifen-Citrat	PLCT FLCT	PLC,nominal: 0.18; 0.56; 1.8; 5.6; 18 µg/L PLC, gemessen im Mittel: 0.1, 0.41, 1.7, 6.0, 18.2 µg/L FLCT, nominal: 0.01; 0.08; 0.6; 5.1 µg/L FLCT gemessen im Mittel: 0.01, 0.07, 0.6, 4.1 µg/L	Dickkopflritze (Pimephales promelas)	- Wachstum, (F1-Generation, juvenil)	1.8 µg/L	- VTG Reduktion - Gonaden- histologie	0.08 µg/L (VTG Männchen) 0.64 µg/L (Gonadenhistologie)	(Williams et al., 2007)	

## Fortsetzung der Tabelle 7

Substanz	Testart	Konzentrationen (nominal/gemessen)	Verwendeter Testfisch	Empfindlichster populationsrelevanter Endpunkt	NOEC Population	Empfindlichster Indikativer Endpunkt	NOEC Indikator	Referenz	Bemerkungen
<b>ANDROGEN REZEPTOR AGONIST</b>									
Trenbolon	Zwei Generationen Test	1; 3; 10; 30; 90 ng/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Geschlechter- verhältnis, (F1-Generation)	3 ng/L	- Gonaden- histologie (Eireifestadien)	<1 ng/L Ei-Debris, Weibchen (F1 Generation)	(Boettcher et al., 2007)	Kein Effekt auf molekulare Biomarker
Trenbolon	FSDT	Nominal: 5; 50; 500; 5000 ng/L Gemessen: <5, 9.7, 23, 193, 2779 ng/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Geschlechter- verhältnis, (F0-Generation)	< 5 ng/L	- VTG Reduktion	23 ng/L	(Holbech et al., 2006)	
Methyltestosteron	FLCT	Nominal: 0.31; 0.98; 3.1; 10; 32 ng/L Gemessen im Mittel: 0.4, 1.1, 3.3, 10, 27.8 ng/L	Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	- Geschlechter- verhältnis, (F0-Generation)	10 ng/L	- VTG Reduktion Weibchen (F1-Generation))	<0.4 ng/L	(Seki et al., 2004)	
<b>ANDROGEN REZEPTOR ANTAGONIST</b>									
Flutamid	Zwei Generationen Test	37.5; 82.2; 189.0, 464.8; 1000 µg/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Eiproduktion, (F0-Generation)	189.0 µg/L	- 11-keto- Testosteron (F1- Generation, Männchen) - VTG Reduktion (F1-Generation, Weibchen)	434.8 µg/L	Eigene Daten Fraunhofer IME	
<b>AROMATASE INHIBITOREN</b>									
Prochloraz	FSDT	16; 64; 202 µg/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Geschlechterverhältnis	64 µg/L	- VTG Induktion Männchen	<16 µg/L	(Kinnberg et al., 2007)	
<b>INHIBITOREN DER STEROID SYNTHESE</b>									
Atrazin	FLCT	0.03; 0.13; 0.54; 2.33; 10 mg/L	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	- Eiproduktion		- Vitellogenin Reduktion		(Nagel et al., 2004)	

**Anhang 3: Protokoll des Fachgesprächs**

**Protokoll des Fachgesprächs „Charakterisierung  
endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen“**

Umweltbundesamt, 21. Juni 2007

---



**Bestandteile des Protokolls**

**Einladung**

**Tagesordnung**

**Präsentationen**

**Thesen und Diskussion**

**Teilnehmer**

## **Einladung zum Fachgespräch**

### **Charakterisierung endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen**

UFOPLAN-Forschungsprojekt FKZ 206 67 470

**21. Juni 2007, 10:00 Uhr**

Umweltbundesamt, Wörlitzer Platz 1, 06844 Dessau

ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim/Main

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, Schmallenberg

Bei der gesetzlichen Umweltrisikobewertung von Stoffen reichen Standardtestmethoden nicht aus, um Störungen des endokrinen Systems adäquat zu erfassen. Die Entwicklung geeigneter Testmethoden bildet seit einigen Jahren einen Schwerpunkt im OECD-Prüfrichtlinienprogramm. Deutschland beteiligt sich dabei u.a. an einem definitiven Langzeittest für die Charakterisierung adverser Effekte auf Reproduktion und Entwicklung von Fischen. In Einzelfällen fordern die Zulassungsbehörden jedoch bereits seit Jahren Lebenszyklus- oder Generationen-Studien mit Fischen für die Stoffbewertung, insbesondere beim Vollzug des Pflanzenschutzgesetzes. Die Unsicherheit, mit der die Bewertung dieser komplexen Studien beim derzeitigen Stand behaftet ist, soll durch eine systematische Sammlung und Auswertung der bisher vorliegenden Anwendungserfahrungen reduziert werden. Darüber hinaus sollen die Ergebnisse zu weiteren Fortschritten in der Testmethodenentwicklung beitragen.

Entscheidend als Selektionskriterium für die Auswahl der Fallbeispiele war die Verfügbarkeit populationsrelevanter Toxizitätsdaten gekoppelt mit einem Verdachtspotential auf endokrine Wirkungen. Vorhandene Studien wurden hinsichtlich der Aussagekraft der erhobenen Parameter für endokrine Wirkungen überprüft. Ausgangspunkt der Untersuchung waren Studien des Fraunhofer-IME mit Substanzen unterschiedlicher sexualendokriner Wirkmechanismen, die um relevante Studien aus dem Datenbestand des UBA und Literaturdaten ergänzt wurden. Soweit die Datenlage dies erlaubte, waren für die unterschiedlichen sexualendokrinen Wirkmechanismen sowohl die Empfindlichkeit und Populationsrelevanz von Endpunkten als auch die Empfindlichkeit verschiedener Testspezies zu vergleichen. Vorgesehen war weiterhin ein Vergleich mit Daten zu denselben Stoffen aus anderen verfügbaren Fischstudien. Ziel war die Festlegung von Kriterien für ein geeignetes Testverfahren zur definitiven Prüfung auf sexualendokrine Wirkungen gegenüber Fischen.

Das Fachgespräch soll einen vertieften inhaltlichen Austausch in einem flexiblen Rahmen ermöglichen. Wir laden dazu eine Reihe von Wissenschaftlerinnen und



Wissenschaftlern ein, die sich in Behörden, Industrie und Forschung besonders mit der Thematik befassen. Nach einer ein- bis zweistündigen Präsentation der Projektergebnisse durch Christoph Schäfers und Matthias Teigeler vom Fraunhofer-Institut soll es nach Bedarf und Interesse Raum zur ausführlichen Diskussion geben sowie eine Gelegenheit zum gemeinsamen Mittagessen. Das Ende ist zwischen 13:00 und 14:00 Uhr vorgesehen.

Das Fachgespräch findet im Besprechungsraum 0.163, im Erdgeschoss auf der linken Seite des Atriums, statt. Gäste lassen sich bitte mit Verweis auf diese Veranstaltung den Zugang ins Atrium vom Pförtner öffnen. Wegen begrenzter Räumlichkeit (für maximal 30 Personen) bitten wir um verbindliche Rückmeldung über beiliegendes Formblatt.

Mit freundlichen Grüßen

i. A.

Petra Greiner

## Tagesordnung

- 10:00 Begrüßung und Hintergrund des Vorhabens (Barbara Werschkun, UBA)
- 10:15 Aufgabenstellung des Vorhabens (Thomas Knacker, ECT)
- 10:30 Charakterisierung endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen - Darstellung eigener Daten und Literaturvergleich (Matthias Teigeler, Fh-IME)
- 11:10 Indikationswert und Populationsrelevanz - Endpunkte in einer Teststrategie für EDCs (Christoph Schäfers, Fh-IME)
- 11:40 Mittagspause
- 12:20 Präsentation von Thesen und Diskussion (Moderation: Thomas Knacker, ECT)
- spätestens
- 13:50 Zusammenfassung und Abschluss (Barbara Werschkun, UBA)

## Präsentationen

Alle Präsentationen sind auf einem Datenträger als power.point.pdf-files diesem Protokoll beigefügt. Anmerkungen und Fragen zur jeweiligen Präsentation sind nachfolgend skizziert.

- Begrüßung und Hintergrund des Vorhabens (Präsentation B. Werschkun, UBA)
- Aufgabenstellung des Vorhabens (Präsentation T. Knacker, ECT)
- Charakterisierung endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen (Präsentation M. Teigeler, IME)

Anmerkungen:

das Datenmaterial ist zu komplex

es fehlen Angaben zu Unterschieden in der Empfindlichkeit der untersuchten Endpunkte in Relation zueinander

Anmerkung zur Sohoni et al. Studie mit BPA: Diese Studie wird/wurde wiederholt: Sie zeigt gleiche Empfindlichkeit, aber mit unterschiedlichen Endpunkten

- Indikationswert und Populationsrelevanz (Präsentation C. Schäfers, IME)
- Thesen zur Diskussion (Präsentation/Moderation T. Knacker, ECT)

## Thesen zur Diskussion

Die nachfolgenden Thesen sind keine regulatorisch verbindlichen Schlussfolgerungen, sondern konzeptionelle Gedanken auf der Grundlage von begründeten Indizien. Die Thesen sollen die Teilnehmer des Fachgesprächs zur Diskussion anregen. Insbesondere die Thesen zu einer Prüfstrategie sind zwischen UBA und Auftragnehmer nicht abgestimmt.

### These 1:

**Biomarker können die durch eine Substanz verursachten sexualendokrinen Wirkungen ausreichend empfindlich indizieren**

### Zu These 1:

Die Gruppierung von Chemikalien nach sexualendokrinen Wirkmechanismen ist eine notwendige Grundlage zur Entwicklung einer Prüfstrategie für die Erfassung endokriner Wirkungen auf Fische.

Populationsrelevante Endpunkte können durch verschiedene Wirkmechanismen betroffen sein. Die durch eine Substanz ausgelöste Veränderung eines populationsrelevanten Endpunktes erlaubt allein keinen Rückschluss auf den Wirkmechanismus.

Die Erhöhung der Vitellogenin (VTG)-Konzentration in Kombination mit der Abnahme der 11-keto-Testosteron (11-kT)-Konzentration ist eine spezifische Anzeige für Östrogenrezeptor-Agonisten. Allerdings ist im Entwurf der OECD für den Fish Screening Assay (FSA) die Bestimmung von 11-kT nicht vorgesehen.

Die Abnahme des VTG-Gehaltes bei gleichzeitiger Zunahme des 11-kT-Gehaltes zeigt sowohl den Wirkmechanismus Aromatasehemmung als auch die Antagonisten des ER oder AR an.

**Diskussionsinhalte/Anmerkungen/Fragen zu These 1:**

die präsentierten Ergebnisse sind sehr „Zebrafisch-lastig“. In der Darstellung wurde die Aussagekraft der sekundären Geschlechtsmerkmale nicht berücksichtigt. Bei anderen Fischarten, insbesondere der Dickkopfelritze, liefern diese zusätzliche wichtige Informationen (an dieser Stelle erfolgte ein Hinweis auf aktuelle Screening-Studien des US EPA mit Dickkopfelritze, in denen die Anwendbarkeit weiterer Endpunkte wie Reproduktion, Steroidhormone, GSI usw. untersucht wird).

Anmerkung zur Präsentation M Teigeler: Frage nach der Empfindlichkeit der nicht-empfindlichsten Endpunkte. In den Fällen, in denen Biomarker nicht die empfindlichsten Parameter sind: Liegen sie wenigstens „in der Nähe“?

Für die untersuchten Androgen-Rezeptor Agonisten ist kein geeigneter Biomarker im FSA enthalten, weder VTG noch 11-keto-Testosteron sind hier ausreichend empfindlich. Suche nach einem androgenen Biomarker? Ideal wäre eine spezifisch androgene Antwort (wie z.B. das Protein Spiggin beim dreistachligen Stichling)

Neben der Frage nach der Empfindlichkeit der Biomarker sollte auch die nach der Selektivität betrachtet werden. Eine eindeutige Selektivität ist momentan bei den Östrogen Rezeptor Agonisten gegeben (Vitellogenin Konzentration im Blutplasma steigt an)

Warnung vor einem Paradigmenwechsel:

Bislang galten Biomarker als Hinweise („signposts“) für weiteres Testen, nicht als Entscheidungsgrundlage bei der Risikobewertung.

Frage nach der Bewertung der Biomarker aus regulatorischer Sicht (UBA)?

Frage: Können Biomarker irgendwann FLCT ersetzen?

**These 2:**

**Die Datenlage über den empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt ist für DMI-Fungizide noch nicht eindeutig bzw. ausreichend (Geschlechterverhältnis? Wachstum? Reproduktion?).**

**Zu These 2:**

Die Veränderung des Geschlechterverhältnisses ist der empfindlichste populationsrelevante Endpunkt für die Aromatasehemmung bei Fischen. Aromatasehemmer werden im FSA durch Abnahme des VTG- und Zunahme des 11-kT-Gehaltes angezeigt.

DMI-Fungizide sind wohl keine „reinen“ Aromatasehemmer, da häufig die Abnahme des VTG- mit dem des 11-kT-Gehaltes kombiniert ist. Da diese Antwortkombination auch bei allgemeiner Steroidsynthesehemmung und systemischer Toxizität auftritt, sind Informationen über das Verhältnis akut-chronische Toxizität (ACR) hilfreich (ACR >> 10: spezifischerer Mechanismus).

**These 3:**

**Falls das Geschlechterverhältnis sich als empfindlichster Endpunkt für alle DMI-Fungizide erweist, kann der FLCT durch den FSDT ersetzt werden.**

**These 4:**

**Für DMI-Fungizide ist die Datenlage ausreichend, um den Endpunkt „Wachstum“ im Early-Life Stage und Juvenile Growth Test als hinreichend sichere Abschätzung des NOEC für den empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkt im Life-Cycle Test zu nutzen.**

**These 5a (Prüfstrategie):**

Der FSA ist Teil des Stufenkonzepts und kann bei spezifischer, mit einem Wirkmechanismus korrelierten Reaktion der Bioindikatoren die Forderung nach oder den Ausschluss von einer weiteren Prüfstufe auslösen. Die höchste zu testende Konzentration im FSA sollte 1/10 der akuten LC50 nicht überschreiten.

**These 5b (Prüfstrategie):**

Die Indikation einer endokrinen Wirkung führt direkt zum definitiven Test.

Der definitive Test ist ein Fish Full Life-Cycle oder zwei Generationen-Test (FLCT oder 2-G-Test).

Bei ausreichender Information über den Wirkmechanismus kann der definitive Test „fokussiert“ werden (z.B. auf den Fish Sexual Development Test; FSDT). Ein Kurzzeit-Reproduktions-Test ist immer unzureichend, da er das empfindlichste Belastungsstadium aller Wirkmechanismen, die Geschlechtsentwicklung, nicht umfasst.

**Diskussionsinhalte/Anmerkungen/Fragen zu Thesen 2-5:**

Aus Zeitgründen konnten die Thesen 2-5 nicht diskutiert werden. Das Gewicht einiger Kernfragen variiert in Abhängigkeit von den verschiedenen regulatorischen Konstellationen: während v.a. bei Industriechemikalien die Verifizierung oder Falsifizierung eines Eingangsverdachts auf spezifische endokrin vermittelte Wirkungen das weitere Vorgehen bestimmt, stellt sich bei Wirkstoffen wie Pflanzenschutzmitteln, Arzneimitteln und Bioziden häufig eher die Frage, ob und wie auf Grundlage bereits vorliegender Informationen verkürzte Teststrategien ausreichen können, um zu ausreichend begründeten regulatorischen Entscheidungen zu kommen.

**Allgemeine Diskussion:**

Für zukünftige Arbeiten wird es als wichtig und wünschenswert angesehen, eine eventuelle Korrelation zwischen Histologie (histopathologische Befundung aus dem FSDT) und späterem Reproduktionserfolg zu untersuchen.

Hierzu werden Zweifel geäußert, dass die histopathologische Befundung eine Vorhersage leisten kann.

Welche Kriterien sind gegeben, um weiteres Testen/Prüfen einzuschränken?

(Kommentar) Die Identifikation des Wirkmechanismus ist wichtig für die Risikobewertung von Kombipräparaten, bestehend aus Wirkstoffen mit gleichgerichteten Wirkmechanismen.

Im definitiven Test sind Biomarker nicht mehr nötig.

(Kommentar zum Fachgespräch) Die Information, insbesondere aus den Vorträgen, war zu verdichtet und daher nicht nachvollziehbar. Mehr Zeit für die Diskussion wäre nötig. Vorschlag: Durchführung eines zweitägigen Workshops.

Eine zeitnahe Diskussion wird als nötig angesehen um insbesondere Ausstiegs-kriterien in der Teststrategie zu erörtern.

Bei dem geplanten Workshop soll ein Meinungsbild/Konsens erreicht werden.

Der Workshop kann Empfehlungen geben (für die EU-Ebene). Wichtig in allen Fällen ist, keinen deutschen Sonderweg zu formulieren.

Die Organisation einer Folgeveranstaltung kann evtl. vom VCI/IVA übernommen werden. Veranstaltungsort wird Berlin sein, als Termin wird Oktober/November 2007 angestrebt.

Zuvor erstellen Auftragnehmer und UBA eine Zusammenfassung des Fachgesprächs, die den Teilnehmern zusammen mit den Vortragsfolien und der Teilnehmerliste zugeht (bis Ende Juli 2007). Die Zusammenfassung kann bis Ende August von den Teilnehmern kommentiert werden.

Die Auftragnehmer erstellen entsprechend bisheriger Vereinbarung bis spätestens Ende Juli 2007 einen ausführlichen Abschlussbericht, der wegen Vertraulichkeit einiger Daten nicht direkt veröffentlicht werden kann. Das UBA prüft, ggf. mit Unterstützung der betroffenen Firmen, ob und wie Teile daraus für die fachliche Diskussion zugänglich gemacht werden können.



## Teilnehmer

<b>Gruppe</b>	<b>Name, Institution</b>
Auftragnehmer	Thomas Knacker, ECT
	Christoph Schäfers, Fh-IME
	Matthias Teigeler, Fh-IME
	Thomas Braunbeck, Uni Heidelberg
Forschung	Stefan Scholz, UfZ-Leipzig
UBA	Adolf Eisenträger, Abt IV 2
	Jean Bachmann, FG IV 2.4
	Tobias Frische, FG IV 2.4
	Hans-Christian Stolzenberg, FG IV 2.4
	Barbara Werschkun, FG IV 2.4
	Susanne Walter-Rohde, FG IV 1.1
	Bettina Rechenberg, FG IV 1.2
	Gabi Vorweg, FG IV 1.3
	Wiebke Schwarzbach, FG IV 1.3
	Marianne Rappolder, FG II 1.2
	Edda Hahlbeck, FG II 2.3
BVL	Martin Streloke
Industrie	Friedrich Dechet, IVA
	Michael Dorgerloh, Bayer Crop Science
	Reinhard Länge, Bayer Health Care
	Norbert Caspers, Bayer Industry Services
	Sabine Zok, BASF
	Robert Spatz, Syngenta
	Hans Rufli, Ecotoxsolutions
	Achim Schmitz, SCC