

UMWELTRISIKOABSCHÄTZUNG

Identifikation geeigneter Nachweismöglichkeiten von hormonaktiven und reproduktionstoxischen Wirkungen in aquatischen Ökosystemen

Robert Kase • Petra Kunz • Almut Gerhardt

Erhalten: 9. April 2009 / Akzeptiert: 9. Juni 2009
© Springer-Verlag 2009-06-10

Verantwortlicher Herausgeber: Henner Hollert

R. Kase (*) • P. Kunz • A. Gerhardt
Oekotoxzentrum,
Eawag /EPFL,
Überlandstrasse 133,
Postfach 611,
8600 Dübendorf, Schweiz
E-Mail: kase.robert@googlemail.com

Zusammenfassung

Hintergrund und Ziel Aus den Ergebnissen umfangreicher Forschungsprogramme, wie z.B. dem Schweizer Forschungsprojekt NFP50 „Hormonaktive Stoffe“ und deren Konsensplattformen zeigt sich ein zunehmender Handlungsbedarf hormonaktive Wirkungen in aquatischen Systemen nachweisen, bewerten und reduzieren zu können. Die EU-Strategie für endokrine Disruptoren beinhaltet als mittelfristige Maßnahmen die Beteiligung der Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) durch die Endocrine Disruptor Testing and Assessment task force (EDTA) und weitere Forschungsaktivitäten. Die Testverfahrensentwicklungen der OECD können erhebliche Beiträge zum Verständnis des Ausmaßes der endokrinen Disruption leisten, sofern diese auch auf Umweltproben angewendet und für Risikominderungsstrategien (z.B. Abwasserbehandlungen) eingesetzt werden. Ziel dieses Review ist es, eine Zusammenfassung und Bewertung von verfügbaren und in der Validierung befindlichen biologischen Testsystemen zu erstellen, mit denen Effekte hormonaktiver und reproduktionstoxischer Substanzen in Gewässern nachgewiesen werden können. Auf dieser Grundlage erfolgt eine Empfehlung einer ökotoxikologischen Testpalette, die es erlaubt, die unterschiedlichen Mechanismen der hormonaktiven Wirkungen und reproduktionsrelevanten Wirkungen zuverlässig in Umweltproben zu erfassen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Testverfahren für geschlechtshormonaktive Substanzen.

Material und Methoden Ausgehend von einer Literaturrecherche und aktuellen internationalen Validierungsaktivitäten für Nachweismöglichkeiten hormonaktiver und reproduktionstoxischer Substanzen und Wirkungen wurden 15 biologische Testverfahren (5 *In vivo*- und 10 *In vitro*- Testverfahren) ausgewählt. Es wurden 8 Verfahren der OECD-EDTA erfasst und 3 von 5 *In vitro*-Verfahren aus dem Global Water Research Coalition (GWRC) Report „Tools to detect estrogenic activity in environmental waters“ (Leusch 2008) ausgewählt. Für diese Testverfahren erfolgte eine Abfrage umfassender Kriterienprofile bei versierten Anwendern und Entwicklern, die vergleichend dargestellt und ausgewertet wurden.

Ergebnisse Wichtige Kriterien bei der Auswahl der Testverfahren waren Normung/Validierung oder Verbreitung und Standardisierbarkeit der Tests sowie eine nachgewiesene Sensitivität in der Bewertung von Umweltproben. Bei den *In vitro*-Tests erfüllen dies unserer Meinung nach bestimmte YES/YAS-Systeme und die ER/AR-Calux-Verfahren. Sollte deren Anwendung durch starke zytotoxische Effekte in Umweltproben behindert werden, kann z.B. ein molekularer Rezeptorbindungsassay, wie der ELRA, Rezeptorbindungspotentiale nachweisen. Weitere molekulare Rezeptorbindungsassays sind derzeit in der Validierung der OECD. Ebenfalls von der OECD für Einzelsubstanzen validiert, kann der H295R Steroidgenese Assay Modulationen der Steroidgenese, und eventuell sogar aromatasemodulierende Effekte nachweisen. Seine Anwendbarkeit auf Umweltproben wird derzeit getestet. Für die *In vivo*- Stufe der modularen Testplattform wurden verschiedene Fischtests (z.B. der Fish Screening Assay und der Fischeitest) bewertet. Um Einflüsse auf das thyroideale Hormonsystem nachzuweisen ist der Amphibian Metamorphosis Assay (in der Abfrage unter XEMA) am weitesten validiert und wird bald als offizielle OECD-Richtlinie erscheinen. Da es sich auch hier um einen Vertebratentest handelt und internationale Bestrebungen bestehen Vertebratentests zu vermeiden, erfolgte nur eine optionale Empfehlung. Reproduktionstoxische Wirkungen können z.B. sehr sensitiv mit Schneckenreproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* nachgewiesen werden. Dieser reagiert auch auf viele Substanzen die in Vertebraten eine endokrine Disruption verursachen. Eine Validierung erfolgt derzeit durch die OECD. Eine Eignung der in der modularen Testpalette vorgeschlagenen Verfahren für Umweltprobenbewertungen wurde angegeben und kann durch mehrere Literaturquellen belegt werden.

Diskussion Es wurde eine anwendungsorientierte modulare Testpalette mit verschiedenen Testverfahren vorgeschlagen, die möglichst effektiv und vielseitig die Mechanismen der endokrinen Disruption und die Reproduktionstoxizität nachzuweisen vermögen und sich dabei in ihren Stärken und unterschiedlichen Arbeitsbereichen ergänzen. Es können fortpflanzungsrelevante Wirkungen an Invertebraten, Amphibien und Fischen und die wirkmechanistischen Ansätze der estrogenen und androgenen Rezeptorbindung, der Steroidgenese, eventuell sogar der Aromatasemodulation erfasst werden. Neuere Forschungsergebnisse, wie z.B. der Forschungsbericht zur Gewässerrelevanz endokriner Stoffe und Arzneimittel (Moltmann et al. 2007), konnten anhand aquatisch relevanter Schadstoffe mit *In vivo*- Tests nachweisen, dass endokrine Endpunkte (bei 31 von 71 untersuchten Stoffen) empfindlicher sein können als allgemeine ökotoxikologische Endpunkte (z.B. Mortalität, Wachstum usw.). Daher wird empfohlen endokrine Effekte nicht isoliert zu betrachten sondern parallel mit allgemeintoxischen und fortpflanzungsrelevanten Wirkungen in ökotoxikologischen Biotestpaletten integrativ zu erfassen.

Schlussfolgerungen Durch die Kombination einer Literaturrecherche und der gezielten Abfrage von Informationen zu den Testverfahren konnte eine umfassende, aber auch detaillierte Übersicht zum derzeitigen Stand der Wissenschaft und Technik gegeben werden. Dabei wurden ökotoxikologische und regulative Aspekte der Testverfahren gleichermaßen berücksichtigt und deren Praktikabilität für ein Umwelmonitoring in aquatischen Systemen bewertet. Bei der Vielfältigkeit der endokrinen Wirkmechanismen bedarf es einer modularen Kombination von *In vivo*- und *In vitro*-Verfahren in einer Testpalette, um auch die fließenden Übergänge von hormonaktiven Wirkungen bis hin zu einer manifestierten endokrinen Disruption erfassen und differenzieren zu können.

Empfehlungen und Perspektiven Die vorgestellte Testpalette erlaubt einen umfassenden Schutz vor hormonaktiven und reproduktionsrelevanten Effekten, wobei eine Anpassung an die Interessen und Zielsetzungen der Anwender erfolgen kann. Es werden sowohl die regulativen und ökotoxikologischen Anforderungen an Testsysteme als auch die aktuellen Entwicklungen in der EU und der OECD mit berücksichtigt. Eine weiterführende Normung dieser Verfahren für den regulativen Einsatz in der Umweltüberwachung und für Risikominderungsstrategien ist zu empfehlen. Das modulare System erlaubt einen anwendungsorientierten Austausch der Testmodule nach dem sich kontinuierlich entwickelnden Stand der Technik ohne Neuentwicklungen auszuschließen.

Schlüsselwörter Aquatische Ökotoxikologie • Biotestpaletten • endokrine Disruption • fortpflanzungsgefährdende Wirkungen • Gewässerschutz • hormonaktive Wirkungen • Monitoring • Normungen • reproduktionstoxische Wirkungen • Teststrategien

Abstract

Identification of reliable test procedures to detect endocrine disruptive and reproduction toxic effects in aquatic ecosystems

Background and objectives There is an urgent need to detect, assess, and reduce effects of hormonally active compounds and endocrine disruptors in aquatic systems, as reflected in national research programs like the Swiss NRP 50 „Endocrine Disruptors“ and its consensus platforms. As a medium-term measure, the EU strategy on endocrine disruptors (SEC(2007)1635) uses the Endocrine Disruptor Testing and Assessment (EDTA) Task Force of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) along with other research activities. In particular the test methods of the OECD that are currently in validation or already validated may contribute to a better understanding of the extent of endocrine disruption, in particular if they are applied on environmental samples and in the context of risk-assessment strategies, for instance in waste water treatment. This article aims to give an overview and an evaluation on available and validated biological test systems for the detection of endocrine disruptive and reproductive effects in aquatic systems. Based on this a recommendation for a modular ecotoxicological test platform is given. The study focuses on test methods for sex hormone active substances.

Material and methods On the basis of an extensive literature search and ongoing international validation efforts by the OECD for methods to detect endocrine disruptive effects, 15 biological test methods (5 *in vivo* and 10 *in vitro*) were selected. Comprising, for example, of eight OECD methods and three out of five *in vitro* methods mentioned in the Global Water Research Coalition (GWRC) report "Tools to detect estrogenic activity in environmental waters" (Leusch 2008). Experienced users and developers were then asked to rate the test according to given relevant criteria. The resulting criteria profiles were compiled, compared, and evaluated.

Results The methods were selected on the basis of validation-status, distribution, their suitability for standardisation, and their proven sensitivity for environmental samples. We assumed that specific YES/YAS-procedures and the ER/AR Calux systems achieve the mentioned criteria. In the case that strong cytotoxicity of environmental samples affects the applicability of cellular reporter gene assays, alternatively a molecular receptor binding assay (e.g. ELRA) could be used. Additional molecular receptor binding assays are currently in validation by the OECD. Modulating effects on steroidogenesis and probably even on aromatase activity can be detected by the OECD validated H295R Steroidogenesis Assay. Its applicability for environmental samples is currently tested. As *in vivo* methods different fish assays (e.g. Fish Screening Assay and the Zebrafish Embryo Test) were evaluated. For the detection of effects on the thyroid hormone associated hormone system the Amphibian Metamorphosis Assay (XEMA) will soon be available as an OECD-Guideline. Because of trends in the international community to avoid tests with vertebrates in the future, only an optional recommendation was given for such tests. Reproduction toxicity, on the other hand, can be sensitively tested by the tests using the gastropod *Potamopyrgus antipodarum*, which, as an invertebrate test, does not require a permit to perform animal testing procedures. This test is also sensitive for many substances which are able to induce an endocrine disruption in vertebrates. Its validation is currently performed by the OECD. The applicability of the herein proposed test methods of the modular test platform for environmental-sample assessments were previously confirmed by several published scientific studies.

Discussion We propose several test methods to be included in an application-oriented modular test platform. These tests should be suitable to efficiently indicate different mechanisms of endocrine disruption and reproduction toxicity, and may be employed in different situations according to their respective advantages. The modular test platform is able to detect impacts on the reproduction relevant effects in invertebrates, amphibians, and fishes. Furthermore the different mode of actions of estrogenic and androgenic receptor binding, steroid genesis and perhaps even the modulation of aromatase are detectable. A research report on the relevance of endocrine substances and pharmaceuticals in aquatic environments (Moltmann et al. 2007) showed that endocrine end-points of *in vivo* tests (31 of 71 tested substances) tend to be more sensitive than general ecotoxicological end-points, such as mortality and growth. Consequently, endocrine and general-toxic effects should be detected in an integrative manner by ecotoxicological test platforms.

Conclusions By combining literature research with a targeted query for information about the chosen test procedures it was possible to obtain a detailed overview about the current state-of-the-art of science and technology in the detection of hormone-active effects and reproduction toxicity. Ecotoxicological and regulative aspects were considered equally, and the applicability of the test procedures was evaluated. Because of the diversity of endocrine disrupting mechanisms, a modular combination of *in vivo* and *in vitro* methods in a joint test platform is needed to recognise and differentiate the transitions from hormone-active effects to endocrine disruption.

Recommendations and perspectives Our study leads to a proposal of a modular ecotoxicological test platform, which offers an integrative detection of hormone-active and reproduction relevant effects in the aquatic environment. The modular system presented here allows the switching between test modules according to the continuously developing state-of-the-art of science and technology as well as the incorporation of novel developments. Further standardisation of such methods for regulative applications is recommended.

Keywords Aquatic ecotoxicology • Biotest battery • Endocrine disruption • Hormone-active effects • Monitoring • Reproduction relevant effects • Reproduction toxic effects • Standardisation • Test strategies • Water pollution control

1 Einleitung

1.1 Hormonaktive Wirkungen und Endokrine Disruptoren

Hormone sind Botenstoffe, die eine Vielzahl von Prozessen zwischen Geweben und Zellen regulieren. So stehen z.B. weibliche und männliche Hormone (Östrogene und Androgene) im Organismus in einem empfindlichen Gleichgewicht, welches durch Stoffe mit hormonaktiven Wirkungen gestört werden kann. Das Ausmaß dieser Störungen wurde in den letzten Jahrzehnten immer deutlicher und steht weiterhin im Blickpunkt wissenschaftlichen und öffentlichen Interesses. Hormone, deren Wirkungsort örtlich getrennt vom Syntheseort liegt, werden endokrine Hormone genannt. Nach der Weybridge-Definition (EU-Konferenz 1996) ist ein endokriner Disruptor eine exogene Substanz oder eine Mischung von Stoffen, die die Funktion des endokrinen Systems ändert und infolgedessen gesundheitsschädigende Wirkung in einem gesundem Organismus, seiner Nachkommenschaft oder einer (Sub)Population hervorruft (EC 1997). Endokrine Disruptoren können natürliche endogene Hormone in ihrer Wirkungsweise nachahmen bzw. hindern oder die Synthese bzw. den Metabolismus dieser Hormone oder deren Hormonrezeptoren stören (Sonnenschein und Soto 1998). Endokrine Disruptoren besitzen demnach eine hormonaktive Wirkung. Eine hormonaktive Wirkung muss jedoch nicht zu einer vollständigen Disruption der hormonellen Gleichgewichtslage führen, da Ausmaß und Wirkrichtung variieren können. Dennoch können hormonaktive Substanzen eine hohe ökotoxikologische Bedeutung besitzen, wenn sie eine Beeinträchtigung der Fortpflanzung von Tieren bewirken und sich auf das Überleben von Populationen auswirken. Der Begriff „hormonaktive Wirkung“ ist genereller und soll eine allgemeine Wirkung auf das hormonelle System beschreiben.

Durch Studien belegte Wirkungen von exogenen hormonaktiven Substanzen und endokrinen Disruptoren in Invertebraten (INV) und Vertebraten (VER), verändert nach (Bätscher et al. 1999, Damstra 2003, FNSNF 2008a, Matthiessen 2000, UBA Texte 65/95):

- Veränderung des Reproduktionsverhaltens und der Reproduktionsfähigkeit (INV, VER)
- Beeinflussung des neurohormonellen Systems und der Immunfunktionen (INV, VER)
- Störung der Gleichgewichtslage von Geschlechtshormonen (INV, VER)
- diverse Veränderungen in Gehirn und Geschlechtsorganen (INV, VER)
- Verlust von Geschlechtszellen, Sterilität oder gar Geschlechtsumwandlung bzw. Intersexstadien (INV, VER)
- Störung der Entwicklung und Beschaffenheit von Spermien und Eizellen (INV, VER)
- Beeinflussung der sekundären Geschlechtsdeterminierung (VER)
- Fehlbildungen in der Embryonalentwicklung (VER)

- Mehrere Studien weisen auf ein erhöhtes Krebsrisiko hin, z.B. für Brust- und Hodenkrebs (VER)

Eine Reproduktionstoxizität kann sowohl durch hormonaktive Substanzen als auch durch unspezifisch wirkende, toxische Substanzen verursacht werden. Aus dieser Vielfalt der möglichen Wirkungen ergeben sich für Ökotoxikologen große Herausforderungen geeignete Verfahren zu entwickeln, die einen Großteil dieser Wirkungen abbilden und für eine Risikoabschätzung herangezogen werden können. So beschäftigten sich mehr als 25 % (67 von 264) der Beiträge auf der europäischen SETAC 2008, eine der wichtigsten internationalen Tagungen für Ökotoxikologen, mit hormonaktiven Wirkungen und mit der Identifikation endokriner Disruptoren. Im Gegensatz zur Vielfalt der möglichen Wirkungen repräsentiert die hormonelle Regulation der biologischen Funktionen ein gemeinsames Charakteristikum für sämtliche tierische Organismen und liegt in den basalen Wirkmechanismen weitgehend phylogenetisch gut konserviert vor (Oehlmann und Schulte-Oehlmann 2003). Trotz der Ähnlichkeiten vieler Systembestandteile besteht auch innerhalb der Invertebraten Taxa eine endokrinologische Variabilität und es ist nach bisherigem Wissensstand nicht möglich Vorhersagen für Wirbeltiere einschliesslich des Menschen abzuleiten. Eine Fokussierung der Untersuchungen auf artübergreifende Endpunkte mit breitem Indikationswert ist sinnvoll.

Eine Einteilung der geschlechtshormonaktiven Substanzen kann nach ihrer Wirkrichtung erfolgen. Entfaltet ein Fremdstoff die gleichen Wirkungen wie beispielsweise körpereigene Östrogene oder Androgene, so wird er als östrogen bzw. androgen bezeichnet. Verhindert ein Stoff jedoch die Wirkung von körpereigenen Geschlechtshormonen, wird seine Wirkung als antiöstrogen bzw. antiandrogen bezeichnet (Fent 2000). Generell lassen sich vermännlichende und verweiblichende Wirkungen unterscheiden. Die Wirkungen können u.a. hormonrezeptorvermittelt, durch Einfluss auf Synthese und Metabolismus von Hormonen, z.B. durch Modulation der Aromataseaktivität oder der Steroidgenese auftreten. Zusätzlich zu den geschlechtshormonaktiven Wirkungen können Endokrine Disruptoren ebenfalls eine Beeinflussung des thyroidalen Hormonsystems oder der glucocorticoidalen Stressantwort auslösen. Unter den hormonaktiven Substanzen sind östrogene Wirkstoffe weitaus besser untersucht, als androgen oder thyroidal wirksame Substanzen. Dieses Verhältnis spiegelt sich auch in der Anzahl bekannter Östrogene zu den anderen Endokrinen Disruptoren wieder. Im Rahmen der EU-Strategie für Endokrine Disruptoren wurden 564 Verdachtsstoffe gelistet (BKH 2000) und durch weitere Verdachtsstoffe ergänzt. Für 71 Stoffe aus einer erweiterten Gesamtliste konnten endokrine Wirkungen auf aquatische Organismen *in vivo* festgestellt werden (Moltmann et al. 2007).

1995 fand das erste Fachgespräch des deutschen Umweltbundesamtes zu Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung statt (UBA-Texte 65/95). Im Rahmen dieses Gesprächs wurde festgestellt :“Die Problematik von Umweltchemikalien, welche auf das endokrine System einwirken, hat in den letzten Jahren große Bedeutung erlangt, weil unerwartete Effekte in aquatischen Ökosystemen beobachtet wurden. (Fent 1995)“ Parallel dazu sind auch Befunde der Toxikologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Säugern veröffentlicht worden, welche die Problematik schlagartig in den Brennpunkt einer breiteren Öffentlichkeit rückten“. Das verstärkte Interesse an endokrinen Disruptoren besteht also schon seit mehr als 10-15 Jahren, seitdem wurde viel Forschung in diese Thematik investiert und hat teilweise auch Eingang in gesetzliche Grundlagen gefunden.

1.2 Gesetzliche Grundlagen und regulatorische Bestrebungen zur Erfassung von hormonaktiven und reproduktionstoxischen Wirkungen

Das Interesse endokrine Disruptoren zu identifizieren ist international. Die US-amerikanische Umweltbehörde (Environmental Protection Agency, US-EPA) erhielt 1996 das legislative Mandat ein Screening-Programm zum Nachweis endokriner Disruptoren (EDSP) zu entwickeln (Hartig et al. 2008). In diesem Programm sollten geeignete Screening-Methoden für endokrine Wirkungen entwickelt, validiert und implementiert werden (Ankley et al. 1997). Viele der nationalen Entwicklungen des EDSP konnten in eine OECD EDTA Richtlinie zur Erfassung endokriner Disruptoren einfließen. Eine Variante dieser Richtlinie ist mittlerweile in Kraft getreten und erfordert eine Neubewertung der Chemikalien bezüglich endokriner Disruptoren in den USA durch die Industrie (US-EPA 2008, 2009). In Japan wurde

1998 ein Strategieprogramm über Endokrine Disruptoren in der Umwelt mit dem Namen SPEED (Strategic Program on Environmental Endocrine Disruptors) initiiert, welches von der japanischen Umweltbehörde geleitet wird (Oikawa und Matsumoto 2003). Schon vor mehr als 10 Jahren wurde im Auftrag des deutschen Umweltbundesamtes der Kenntnisstand von über 200 als endokrin wirksam verdächtigen Umweltchemikalien anhand der Literatur zusammengetragen (Gülden et al. 1997). Neben der hormonellen Wirksamkeit wurde die Gewässerrelevanz dieser Stoffe anhand von Messdaten aus einer Umfrage bei den Bundesländern und aus den Datenbanken des Umweltbundesamtes, der Flussgebietsgemeinschaften sowie anhand von Erkenntnissen zu Produktion und Verhalten dieser Stoffe in der Umwelt bewertet. Aussagen zur Gewässerrelevanz der Stoffe erwiesen sich jedoch als nur bedingt möglich, da für die Mehrzahl der Stoffe keine Messdaten im Gewässer vorlagen und außerdem die relative Wirksamkeit der Stoffe nicht bekannt war.

Das Schweizer Bundesamt für Umwelt (BAFU) kam in Kooperation mit der Eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (Eawag) 1999 zu dem Schluß, dass sowohl im Bereich der Belastungssituation als auch im Bereich der Wirkungen, ein erheblicher Forschungsbedarf besteht (Bätscher et al. 1999). Auf eine Initiative des Schweizer Bundesrates wurde von 2002 bis 2007 das nationale Forschungsprogramm 50 (NFP 50) "Hormonaktive Stoffe: Bedeutung für Menschen Tiere und Ökosysteme" durchgeführt und umfasste 31 wissenschaftliche Projekte (FNSNF 2008a). In diesem Forschungsprogramm, sollten Strategien zur Beurteilung der Risiken und Gefahren der Belastung von Menschen, Nutz- und Wildtiere und der Umwelt durch hormonaktive Stoffe in Ökosystemen entwickelt werden. Auf der Basis der Forschungsergebnisse wurden gemeinsam mit Behörden und Industrie Empfehlungen in drei Konsensplattformen ausgearbeitet, die mithelfen sollen, negative Folgen hormonaktiver Chemikalien zu vermeiden. Besonders für eine Erfassung der Situation der hormonaktiven Stoffe im Abwasser- und Gewässerbereich ist das Abschlussdokument der Konsensplattform (FNSNF 2008b) bestens geeignet, da es ebenfalls den weiteren Forschungs- und Handlungsbedarf darstellt. Aufgrund der Länge des Artikels kann hier nur ein gekürzter Auszug für die Testverfahren gegeben werden:

„Durch Abwassereinleitungen dürfen sich im Fließgewässer keine Effekte aufgrund der aus dem Abwasser zugeführten östrogenen Stoffe ergeben (Schutzziel). Die Gesamtbelastung von Gewässern mit hormonaktiven Stoffen könnte mit Biotests in Speziallabors bestimmt werden. Diese sind für eine Gesamtbeurteilung einer Einzelstoffanalytik vorzuziehen. Es ist aber praktisch unmöglich, mit gängigen Testverfahren Qualitätskriterien festzulegen, die alle Organismen vor nachteiligen Effekten schützen. Die rasche Entwicklung von international anerkannten Verfahren zum Nachweis hormonaktiver Eigenschaften von Chemikalien und Gemischen muss gefördert werden. Das Gleiche gilt für Testverfahren zur Priorisierung von Mikroverunreinigungen und zur Überwachung der Gewässerqualität. Für die Praxis ist die Etablierung von wissenschaftlich fundierten Qualitätskriterien für die Gewässerqualität anzustreben: ein chronisches Qualitätskriterium für Dauerbelastungen und ein akutes Qualitätskriterium für kurzfristige Spitzenbelastungen. Es wird empfohlen, die Gewässerschutzverordnung mit diesen Qualitätskriterien zu ergänzen.“

In Europa werden in der laufenden Umsetzung der europäischen Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG (WRRL) 2000, COM (2006) 397 final) im Hinblick auf die Minderung gefährlicher Chemikalien in Oberflächengewässern, zunehmend auch endokrine Wirkungen berücksichtigt. Die EU-Strategie für endokrine Disruptoren (COM (99)706 1999, SEC(2007)1635 2007) sieht eine Reihe von kurz-, mittel- und langfristigen Maßnahmen vor, zu denen auch die Erstellung einer Liste potentiell endokriner Stoffe und ihre Priorisierung zählen. Eine solche Liste wurde 2000 erstellt (BKH 2000) und von der EU-Kommission vorgestellt. Ausgehend von 564 Substanzen wurden in einem vierstufigen Verfahren 60 Substanzen mit hoher Priorität identifiziert. Diese Substanzen zeigten sich in mindestens einer *In vivo*-Studie als endokrin wirksam und waren persistent oder traten in hohen Produktionsvolumina auf. Der Bericht räumte jedoch umfangreiche Lücken im Wissensstand zu den endokrinen Disruptoren ein und beinhaltete auch mehrfache Empfehlungen für eine weitere Bewertung dieser Chemikalien. So wurde u. a. empfohlen, dass Standardtests entwickelt werden müssen, um Endokrine Disruptoren identifizieren zu können und eine Risikobewertung nur möglich ist, wenn vereinbarte Testverfahren verfügbar sind. In einem Folgeprojekt wurde versucht ein Teil der Datenlücken für 435 Substanzen zu schließen (RPS BKH 2002). Die aktuelle Ergebnisliste zu dieser Gesamtliste befindet sich in einem Arbeitsdokument der EU-Kommission (SEC(2007)1635 2007) und behandelt auch die Implementierung der europäischen Strategie für

endokrine Disruptoren. Die Gewässerrelevanz der potentiellen endokrinen Disruptoren wurde in einem Forschungsprojekt des deutschen Umweltbundesamtes untersucht. Für 71 Stoffe aus einer erweiterten Gesamtliste konnten endokrine Wirkungen auf aquatische Organismen *in vivo* festgestellt werden (Moltmann et al. 2007). Jedoch lagen nur für 38 von 71 dieser Stoffe Messdaten zu Umweltkonzentrationen aus Oberflächengewässern vor, so dass auch nur teilweise Umweltqualitätsnormvorschläge abgeleitet werden konnten. Mit *In vivo*-Tests konnte gezeigt werden, dass endokrine Endpunkte (bei 31 von 71 untersuchten Stoffen) empfindlicher sein können als allgemeine ökotoxikologische Endpunkte (z.B. Mortalität, Wachstum usw.). Eine Erfassung der endokrinen Wirkung durch Einbindung in Monitorprogramme wurde angeregt, indem beispielsweise die integrierte Kombination aus biologischen Wirkungstests und chemischen Analysen untersucht wird, um grundsätzlich Wirkungen in Gewässern festzustellen und sie bestimmten Stoffen zuordnen zu können (Moltmann et al. 2007).

Reproduktionstoxische Wirkungen fanden Einzug in die Pflanzenschutzmittelrichtlinie (91/414 EWG) und der europäischen Chemikalienbewertung nach REACH (Registration Evaluation Authorisation of Chemicals). Die Umsetzung der Pflanzenschutzmittelrichtlinie und REACH könnten sich mittel- und längerfristig mildernd auf die Belastungssituation aquatischer Systeme mit reproduktionstoxischen und endokrinen Substanzen auswirken. Beide beinhalten neben anderen toxikologischen Wirkungen auch Erfassungen von reproduktionstoxischen Endpunkten und setzen diese teilweise um. So unterliegen in REACH karzinogene, mutagene und reproduktionstoxische Substanzen (CMR-substances) einer gesonderten Zulassungspflicht. Dabei müssen chronische Wirkungen aber generell erst bei höheren Jahrestonnagen (>100 t/a) untersucht werden und die Testung auf reproduktionstoxische Effekte im Zwei-Generationen-Test sind erst ab 1000 t/a verpflichtend. Endpunkte für Substanzen mit hormonaktiver Wirkung sind zur Zeit weder in REACH noch in der Pflanzenschutzmittelrichtlinie zwingend erforderlich und es stellt sich die Frage inwieweit und wann diese regulatorischen Instrumente helfen werden die vorhandene Belastungssituation durch hormonaktive Substanzen zu minimieren. Als besonders nachhaltig sind Maßnahmen anzusehen, die zu einer Minimierung der endokrin wirksamen Substanzen an der Quelle der Anwendung bzw. der Emission führen (Moltmann et al. 2007). So wäre z.B. ein Abwassermonitoring mit entsprechenden Behandlungsmethoden wünschenswert und im Sinne einer Erreichung eines geforderten guten ökologischen Zustandes nach der europäischen Wasserrahmenrichtlinie. Aktuelle Ergebnisse aus dem EU-Projekt Neptun weisen daraufhin, dass die Ozonung von Abwasser zumindest zu einer Reduzierung der Östrogenität führen kann und dabei in einem akzeptablen Kostenrahmen bleibt.

2 Methoden

2.1 Nachweismöglichkeiten hormonaktiver und reproduktionstoxischer Substanzen

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über verschiedene, vorwiegend biologische Nachweismöglichkeiten hormonaktiver und reproduktionstoxischer Substanzen. Es stellt keine allumfassende Auswertung der wissenschaftlichen Studien zu diesen Themen dar, da dies den Rahmen sprengen würde.

Von den mehr als 100 000 Chemikalien, die in der europäischen Liste der existierenden Chemikalien geführt werden (Commission of the European Communities 1996) sind nur für wenige Substanzen überhaupt Daten für endokrine Wirkungen erhoben worden und nur für einige kann überhaupt eine potentielle östrogene Aktivität angegeben werden. Daher ist anzunehmen, dass für eine unbekannt hohe Anzahl an Substanzen und auch deren Metabolite und Derivate eine endokrine Aktivität besteht, die derzeit nicht quantifiziert werden kann, weil die nötigen Studien und allgemein akzeptierte Methoden fehlen. Es wird deutlich, dass neben den sich kontinuierlich entwickelnden analytischen Verfahren weitere integrative Detektionsmöglichkeiten für hormonaktive Wirkungen entwickelt und eingesetzt werden sollten. Im folgenden Abschnitt sollen daher verschiedene Nachweismöglichkeiten für endokrine Disruptoren und hormonaktive Substanzen mit ihren wesentlichen Vor- und Nachteilen beschrieben werden.

2.2 Der chemisch-numerische Ansatz zur Erfassung von Belastungen und strukturbezogene Vorhersagemodelle

Eine chemische Analyse gibt Aufschluss über die stoffliche Natur einer Belastung. Ihre Aussagekraft bleibt auf die gemessenen Parameter (Konzentration, Gehalt, selten auch die Speziation) beschränkt und sagt nichts über den zu erwartenden endokrinen Effekt aus, insbesondere bei Substanzen, deren mögliche endokrine Aktivität noch nicht untersucht wurde. Aus einer Vielzahl von Probeninhaltsstoffen kann meist nur ein kleiner Teil gemessen werden. Die analytischen Verfahren mit denen Substanzen mit bekannter östrogenen Aktivität in Umweltproben nachgewiesen werden können, werden kontinuierlich weiterentwickelt (Desbrow et al. 1998, Spengler et al. 2001). Neuere Studien weisen daraufhin, dass es gute Korrelationen zwischen den Ergebnissen von analytischen Verfahren für bekannte hormonaktive Substanzen und *In vitro*-Ansätzen für Abwasseruntersuchungen gibt (Nelson et al. 2007, Leusch 2008). Für den Fall, dass man die Struktur eines Stoffes kennt und seine Wirkung vorhersagen möchte, gibt es mittlerweile Vorhersagemodelle. Ein Instrument ist die quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR). Hierbei wird eine quantitative Beziehung zwischen einer physikalischen, chemischen oder biologischen Wirkung eines Stoffes zu seiner Struktur erstellt und berechnet. Neuere Weiterentwicklungen des QSAR, wie z.B. das VirtualToxLab ermöglichen es für verschiedene Substanzen die Bindung an verschiedenen Rezeptoren vorherzusagen (Vedani et al. 2008).

Bei all diesen Entwicklungen sollte berücksichtigt werden, dass ein toxikologisches und endokrines Potential nur bei ausreichender Kenntnis der Schadstoffe, sowie deren gegenseitiger Beeinflussung abgeschätzt werden kann. Die Zahl der im Oberflächen- und Abwasser eingetragenen und teilweise auch gezielt eingesetzten Einzelsubstanzen liegt auch in der Größenordnung um 100 000 (Pluta 2008a). Aufgrund der stofflichen Vielfalt der Substanzen und deren vielfältige Wirkungsrichtungen ist eine Erweiterung des chemisch-numerischen Ansatzes um eine ökotoxikologische Gefahrenpotentialabschätzung unausweichlich. Die ökotoxische Wirkung eines Stoffes ist abhängig von seinen chemisch-physikalischen Eigenschaften, seiner Dosis, der Expositionsdauer, dem Expositionszeitpunkt sowie seiner Aktivität und Bioverfügbarkeit. In der Regel sind daher eine Kombination von analytischen und ökotoxikologische Ansätzen für eine wirkungsorientierte Betrachtung zu bevorzugen, da diese eine integrale oder summarische Wirkungserfassung ermöglichen und auch Mischungstoxizitäten von Schadstoffen berücksichtigen können.

2.3 Biologische Nachweisverfahren und ökotoxikologische Ansätze

Biologische Verfahren können die analytisch nicht erfassten oder nicht erfassbaren Kontaminanten anhand ihrer Schadstoffwirkung anzeigen, dabei ermöglichen sie aber keinen quantitativen oder qualitativen Stoffnachweis. Mit biologischen Testverfahren können sowohl ökotoxikologische Wirkungen von Einzelstoffen (agonistische/induzierende und antagonistische/inhibierende) als auch Kombinationswirkungen (additive, synergistische, aber auch kompetitive und inhibitorische Effekte) aller vorhandenen Kontaminanten erfasst werden. Diese integrative Erfassung von Schadstoffwirkungen macht die ökotoxikologische Untersuchung als Entscheidungshilfe für ein Umweltmanagement unentbehrlich (Krebs 2001). Bei der Vielfältigkeit ökotoxikologischer Ansätze zur Bestimmung der hormonaktiven Wirkungen lassen sich zwischen *In vitro*- und *In vivo*-Testverfahren unterscheiden.

2.3.1 *In vitro*-Testverfahren

In vitro-Testverfahren sind suborganismische Testverfahren, die zelluläre oder subzelluläre Systeme benutzen. Sie erfassen die Wirkungen von Einzelstoffen, Stoffgemischen oder Umweltproben auf isolierte Teile von Organismen (Gewebe, Zelle, Zellkompartimente und Biomoleküle) unter Laborbedingungen. Sie dienen der Erfassung von biologischen Wirkungen auf zellulärer, molekularer und biochemischer Ebene und vermögen primär kurzfristige und direkte ökotoxikologische Wirkungen anzuzeigen. Mit ihnen können vielfältig gerichtete Wirkungen angezeigt werden (pro Testverfahren aber meist nur eine oder wenige) deren Mechanismen biologisch so elementar sind, dass sie für mehrere Organismengruppen

gleichzeitig Wirkpotentiale aufzeigen können. **Abb. 1** soll einen Überblick über die Vielfältigkeit und die Ansatzpunkte von *In vitro*-Biotestverfahren für eine Erfassung hormonaktiver Wirkungen geben.

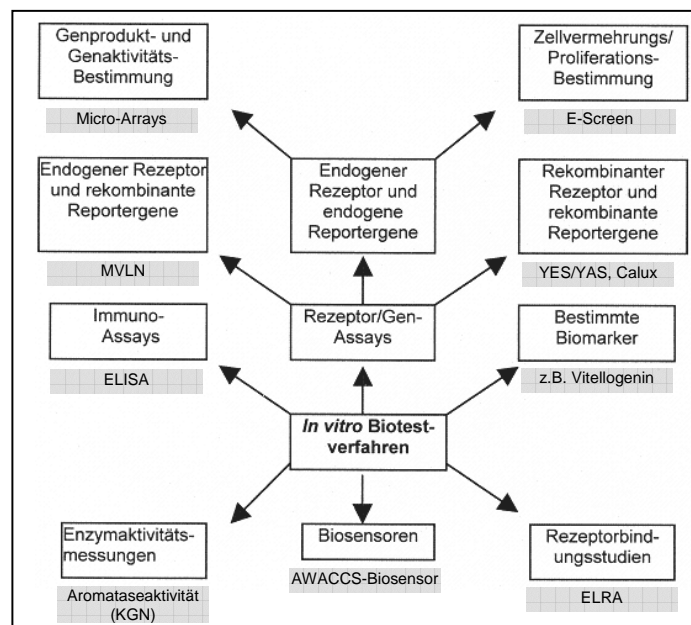


Abb. 1 *In vitro*-Testverfahren zur Bestimmung von hormonaktiven Wirkungen, verändert nach (Kase 2004); Beispiele wurden grau hinterlegt und werden im Verlauf des Manuskriptes erläutert. Ebenfalls stellt die Modulation Steroidgenese eine Angriffsfläche für endokrine Disruptoren dar, die *in vitro* erfasst werden kann.

Ein wesentlicher Nachteil dieser Testsysteme beruht in der begrenzten Übertragbarkeit der Untersuchungsergebnisse auf die relevanten Gesamtorganismen, denn nicht alle möglichen Wirkungspotentiale (z.B. durch Bioakkumulation und Bioaktivierung von Schadstoffen) können mit *In vitro*-Verfahren abgebildet werden (Leusch 2008). So werden z.B. organismische low-dose Effekte, die nur über lange Expositionszeiten nachgewiesen werden können, nicht erfasst. Ebenso werden kritische Expositionszeitpunkte in der Ontogenese von Organismen nicht berücksichtigt.

Doch sind auch komplexe ökotoxikologische Wirkungen auf Organismenebene letztlich auf eine Kombination von molekularen und biochemischen Wirkungsmechanismen zurückzuführen und so besitzen einige dieser Verfahren einen hohen Indikationswert für eine hormonelle Aktivität. Zudem ist der Nachweis direkter Wirkungen durch suborganismische Testsysteme weniger stark durch Störanfälligkeit und Variabilität organismischer Testverfahren limitiert, was den detektierbaren Konzentrationsbereich für Ursache-Wirkungsbeziehungen erweitert.

So können mit molekularbiologischen Methoden auch Reportergene in Zellen transfiziert werden, die bei einer Bindung von hormonaktiven Stoffen an Rezeptoren exprimieren und so z.B. über eine Enzymaktivität ein messbares Signal erzeugen (**Tab. 1 und 2**). Insgesamt stellen die *In vitro*-Testsysteme eine schnelle und wirtschaftliche Ergänzung zu den *In vivo*-Testsystemen dar, besonders wenn es um ein wirkmechanistisches Screening des toxikologischen Potentials für Umweltproben geht. Eine Voraussetzung sollte sein, dass diese *In vitro*-Tests relativ sensitiv sind und ohne aufwändige, und die Bioverfügbarkeit verändernde Probenvorbereitungen einsetzbar sind. Ein Großteil verwendeten *In vitro*-Verfahren beruht auf östrogenrezeptor vermittelten Antworten, die sich als Screening-Verfahren für Xenooöstrogene eignen (Ankley et al. 1997; Nelson et al. 2007; Zacharewski 1997). *In vitro*-Testverfahren haben sich als sensitive Methoden für eine Bewertung der hormonaktiven Wirkungen bewährt und erlauben quantitative Abschätzungen der Aktivität von beispielsweise partiellen rezeptorvermittelten Antworten (Hollert et al 2005). Auch nicht rezeptorvermittelte Wirkmechanismen wie Modulationen der Aromataseaktivität (Andersen et al. 2002) oder der Steroidgenese (Gracia et al. 2008; Hecker et al. 2007) können mit *In vitro*-Verfahren erfasst werden. Ergänzend zu der Auflistung in Tab. 1 und 2 gibt es einen Literatur-Review (Global Water Research Coalition 2006) über *In vitro*-Biotests, der insgesamt 24 Testverfahren

(3 Rezeptorbindungsassays, 5 rekombinante Hefeassays, 9 rekombinante Säugerzellen-Reporter-Testverfahren, 1 rekombinanten Fischzellen Reporter-Testverfahren, 4 Genexpressionsverfahren und 2 Zellproliferationsassays) auflistet und bewertet. Ebenfalls gibt es einen Vergleich von *In vitro*-Verfahren von der Danish-EPA (Kinnberg 2003), der Rezeptorbindungsassays, Reportegeneassays und den E-Screen (Zellproliferationsassay) beschreibt und bewertet.

Biosensoren können zu den *In vitro*-Verfahren gezählt werden und sind bioanalytische Systeme, die mit biologischen Komponenten ausgestattet sind. Biosensoren basieren auf der direkten räumlichen Kopplung eines immobilisierten biologisch aktiven Systems mit einem Signalumwandler (Transduktor) und einem elektronischen Verstärker. Für die Erkennung der zu bestimmenden Substanzen nutzen Biosensoren biologische Systeme auf unterschiedlich hohem Integrationsniveau. Solche biologische Systeme können z.B. Antikörper, Enzyme, Organellen oder Mikroorganismen sein. Das immobilisierte biologische System des Biosensors tritt in Wechselwirkung mit dem Analyten (Eggins und Brian 2002, Gerhardt 1999). Beispiele für Biosensoren im Zusammenhang mit dem Nachweis von hormonaktiven Substanzen stellen Multianalytbestimmungen über Immunoassays (Proll 2005) oder integrale Rezeptorbindungserfassungen (Fechner et al. 2008) dar.

Tab. 1 und 2: *In vitro*-Testverfahren zur Erfassung hormonaktiver Wirkungen. Die folgende Tabelle gibt nur einen Ausschnitt an verwendeten *In vitro*-Verfahren nach einer zeitlich begrenzten Literaturrecherche wieder. Die Angaben erfolgten als Probenkonzentrationen; E01 steht für 10¹, E02 steht für 10² usw.

Abkürzungen: E2=“17-β-Estradiol“; EE2=“17-α-Ethinylestradiol; T=“Testosteron“;DHT=“Dihydrotestosteron“, „—“= nicht aus der Literaturquelle abzuleiten oder mit anderen Referenzsubstanzen getestet.

Abkürzung	Organismus/System	Endpunkte	Organisationslevel	Versuchsdauer	LOEC oder ECx	EC ₅₀	EC _{max}	Einzelsubstanz	Umweltprobe	Referenz
Biosensoren										
AWACCS	Biosensor aus dem AWACCS-Projekt	verschiedene Umweltschadstoffe werden in einem vollautomatisierten Immunoassay im unteren ng/l Bereich detektiert	molekular	—	—	—	—	X	X	(Proll 2005)
—	Biosensor	nanomechanischer Transducer detektiert EDC	molekular	—	2,72 ng/l E2	—	2,72 E04 ng/l E2	X		(Dutta et al. 2007)
—	Biosensor	lumineszente Hefezellen mit ER-α werden vom Glasfaseroptischen Biosensor erfasst	zellulär	2,5 h	80 ng/l E2; 0,6 ng/l EE2	640 ng/l E2; 390 ng/l EE2	—	X	X	(Fine et al. 2006)
Rezeptorbindungsassays										
AR	Androgenrezeptorbindungsassay	Verdrängung von ³ H-R1881 an Schimpansen-Androgenrezeptor	molekular	—	—	600 ng/l DHT	—	X		(Hartig et al. 2008)
AR	Androgenrezeptorbindungsassay	Verdrängung von ³ H-R1881 an Ratten-Androgenrezeptor	molekular	—	—	1200 ng/l DHT	—	X		(Hartig et al. 2008)
AR	Androgenrezeptorbindungsassay	Verdrängung von ³ H-R1881 an dem humanen Androgenrezeptor	molekular	—	—	7300 ng/l DHT	—	X		(Hartig et al. 2008)
ER	Östrogenrezeptorbindungsassay	Verdrängung von ³ H-E2 an dem humanen Östrogenrezeptor-alpha	molekular	—	—	953 ng/l E2; 889 ng/l EE2	—	X		(Gutendorf und Westendorf 2001)
ER	Östrogenrezeptorbindungsassay	Verdrängung von ³ H-E2 an dem humanen Östrogenrezeptor-beta	molekular	—	—	17,7 E03 ng/l E2; 13,4 E03 ng/l EE2	—	X		(Gutendorf und Westendorf 2001)
ER	Östrogenrezeptorbindungsassay	Verdrängung von ³ H-E2 an dem humanen Östrogenrezeptor	molekular	—	—	2,7 E02 ng/l E2	2,7 E04 ng/l E2	X		(Körner et al. 1997)
ER	Östrogenrezeptorbindungsassay	Verdrängung von ³ H-E2 an dem humanen Östrogenrezeptor	molekular	—	272 ng/l E2	1,36 E03 ng/l E2	—	X	X	(Murk et al. 2002)
ELRA	Enzyme-Linked-Receptor-Assay	Agonistische und antagonistische Bindung an dem humanen Östrogenrezeptor alpha	molekular	4 h	EC ₂₀ = 36 bis 61 ng/l E2	191-243 ng/l E2	>10 E03 ng/l E2	X	X	(Kase et al. 2007, Kase et al. 2008, Seifert 1999, Seifert et al. 1999)
Rekombinante Hefeassays										
YAS	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines androgenabhängigen Reportergens für hAR	zellulär	—	2 ng/l DHT	—	—		X	(Thomas et al. 2002)
YES	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	EC ₁₀ = 2,72 ng/l E2	27,2 ng/l E2	—	X		(Legler et al. 2002)
YES	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	—	81 ng/l E2	—	X	X	(Garcia-Reyero 2001)
YES	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	10,6 ng/l E2; 10,7 ng/l EE2	41,7 ng/l E2; 51,6 ng/l EE2	—	X		(Belt et al. 2004)
YES	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	2,72 ng/l E2	27,2 ng/l E2	—	X	X	(Murk et al. 2002)
YES	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	—	65,9 ng/l E2	—	X	X	(Nelson et al. 2007)
YES	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	—	27 ng/l E2	2,7 E03 ng/l E2	X		(Körner et al. 1997)
YES	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	—	57 ng/l E2; 86 ng/l EE2	—	X		(Folmar et al. 2002)
YES	rekombinant veränderte Hefezellen	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	—	218 ng/l E2; 54,5 ng/l E2148 ng/l EE2; 17,8 ng/l EE2	—	X		(Andersen et al. 1999)
	mit Plasmiden transformierte Hefezellen des Stammes BMA64-1A	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines androgenabhängigen Reportergens für hAR	zellulär	—	14,42 ng/l T	2884 ng/l T	—	X	X	(Michelini et al. 2005)
rt-YES	rekombinant veränderte Hefezellen mit Regenbogenforellen-Östrogenrezeptor	Messung einer Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für rt-ER	zellulär	—	—	4,93 E03 ng/l E2	—	X		(Kunz et al. 2006)

Abkürzung	Organismus/System	Endpunkte	Organisationslevel	Versuchsdauer	LOEC oder ECx	EC ₅₀	EC _{max}	Einzelsubstanz	Umweltprobe	Referenz
Proliferationsbestimmung										
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie	Messung der Zellproliferation einer humanen Brustkrebszelllinie	zellulär	144 h	0,27 ng/l E2	—	27 ng/l E2	X		(Andersen et al. 2002)
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie	Messung der Zellproliferation einer humanen Brustkrebszelllinie	zellulär	144 h	—	1,4 ng/l E2; 1,19 ng/l EE2	—	X		(Gutendorf und Westendorf 2001)
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie	Messung der Zellproliferation einer humanen Brustkrebszelllinie	zellulär	144 h	0,27 ng/l E2	2,7 ng/l E2	27 ng/l E2	X		(Körner et al. 1997)
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie	Messung der Zellproliferation einer humanen Brustkrebszelllinie	zellulär	144 h	—	8,7 ng/l E2; 5 ng/l EE2	—			(Folmar et al. 2002)
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie	Messung der Zellproliferation einer humanen Brustkrebszelllinie	zellulär	144 h	—	0,163 ng/l E2; 1,91 ng/l E2; 0,0272 ng/l E2	—	X		(Andersen et al. 1999)
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie	Messung der Zellproliferation einer humanen Brustkrebszelllinie	zellulär	144 h	—	14,5 ng/l E2	—	X	X	(Nelson et al. 2007)
Rekombinante zelluläre assays										
—	durch Transfektion veränderte Brustkrebszelllinie	Messung einer Luziferaseaktivität und Galaktosidaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER	zellulär	—	2,7 ng/l E2	—	2724 ng/l E2	X		(Anderson et al. 2002)
MVLN	durch Transfektion veränderte Brustkrebszellen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	144 h	0,8 ng/l E2	4,1 ng/l E2	—	X		(Belt et al. 2004)
MVLN	durch Transfektion veränderte Brustkrebszellen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	144 h	—	1,4 ng/l E2; 1,19 ng/l EE2	—	X		(Gutendorf und Westendorf 2001)
ER-Calux	humane rekombinant veränderte Brustkrebszellen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	>48 h	EC ₁₀ = 0,14 ng/l E2	1,63 ng/l E2	—	X	X	(Legler et al. 2002)
ER-Calux	humane rekombinant veränderte Brustkrebszellen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	>48 h	0,136 ng/l E2	1,63 ng/l E2	—	X	X	(Murk et al. 2002)
ER-Calux	humane rekombinant veränderte Brustkrebszellen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	>48 h	—	4,3ng/l E2; 2,35 ng/l EE2	—	X		(Takeyoshi 2006)
ER-Calux	humane rekombinant veränderte Brustkrebszellen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogenabhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	>48 h	—	3,27 ng/l E2	—	X	X	(van der Linden et al. 2008)
AR-Calux	humane rekombinant veränderte Brustkrebszellen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines androgenabhängigen Reportergens für einen hAR	zellulär	> 48 h	—	92,9 ng/l DHT	—	X	X	(van der Linden et al. 2008)
T-47D-Kblue C	humane rekombinant veränderte Brustkrebszelllinie T-47D-KblueC	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogen abhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	>48h	0,272 ng/l E2	0,817 ng/l E2	27,23 ng/l E2	X		(Wilson et al. 2004)
TA-Assay	hER-HeLa-9903-Zelltest	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogen abhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	>3h	—	2,23ng/l E2; 1,68 ng/l EE2	—			(Takeyoshi 2006)
HGELN	mit Plasmiden veränderte HeLa-Zellen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogen abhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	—	—	10,9 ng/l E2; 2,07 ng/l EE2	—	X		(Gutendorf und Westendorf 2001)
RTG-2	Regenbogenforellen-Gonaden-Zellen mit ER-alpha abhängigen Reportergen	Messung einer Luziferaseaktivität als Maß für die Induktion eines östrogen abhängigen Reportergens für ER alpha	zellulär	—	14 ng/l E2; 1,48 ng/l EE2	90 ng/l E2; 26,7 ng/l EE2	2,72 E03 ng/l E2	X	X	(Ackermann et al. 2002)
In vitro- Biomarker										
Amphibien-Hepatozyten	Hepatozyten vom südafrikanischen Krallenfrosch (<i>Xenopus laevis</i>)	m-RNA-Induktion für Vitellogenin durch östrogene Substanzen	zellulär	36 h	272,4 ng/l E2	—	2,72 E05 ng/l E2	X		(Kloas et al. 1999)
Fisch-Hepatozyten	Hepatozyten der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Messung der Vitellogeninproduktion von Hepatozyten, welche durch Östrogene induziert wird	zellulär	> 8 d	—	493 ng/l E2	—	X	X	(Jobling und Sumpter 1993)
Fisch-Hepatozyten	Hepatozyten verschiedener Fischarten	Messung der Vitellogeninproduktion von Hepatozyten, welche durch Östrogene induziert wird	zellulär	—	272,4 E-03 bis 272,4 E03 ng/l E2	272,4 E-02 bis 272,4 E03 ng/l E2	—	X		(Navas und Segner 2006)
Steroidgenese und Aromataseaktivität										
H295R Steroidgenese Assay	H295R Adrenokarzinom-Zellen	Modulation der Steroidgenese <i>in vitro</i>	zellulär	48 - 72 h	—	—	—	X	X	(Gracia et al. 2008, Hecker et al. 2007)
—	Aromataseaktivität humaner placentaler Microsomen	Szintillationsmessung der Aromataseaktivität	molekular	—	—	—	—	X		(Andersen et al. 2002)

2.3.2 Biomarker und Bioindikatoren

Eine Zwischenstellung zu den *In vivo*- und *In vitro*-Testverfahren stellen einige Biomarkersysteme dar, die meist mit einer Exposition des gesamten Organismus arbeiten, aber nur einen physiologischen suborganismischen Parameter, wie z.B. eine Enzymaktivität erfassen. Ein Biomarker ist ein molekularer, biochemischer, zellulärer oder physiologischer Parameter, der sich durch äußere Stressoren verändert. Depledge und Fossi haben 1998 den Begriff ausgeweitet und Biomarker auf verschiedenen biologischen und ökologischen Organisationsebenen definiert (Depledge und Fossi 1998). Dennoch können in einigen Fällen suborganismische Biomarker einen Indikationswert für Folgeeffekte auf organismischer oder vielleicht sogar auf populationsrelevanter Organisationsebene darstellen. So kann z.B. eine Hemmung der Aromatase (CYP 19) einer Cytochrom-P₄₅₀ abhängigen Monoxygenase, die u.a. für die Umbildung von Testosteron zu Estradiol zuständig ist, eine Verschiebung des Geschlechtshormonspiegels bewirken. Eine Ausbildung von Imposexstadien steht bei bestimmten Gastropodenarten in Zusammenhang mit einer Exposition gegenüber Organozinnverbindungen, kann aber auch durch andere endokrine Disruptoren bewirkt werden (Schulte-Oehlmann et al. 2001). Bei Gastropoden wird die Ausbildung von Imposexstadien durch den Mechanismus der Aromatasemodulation parallel zu anderen Hypothesen diskutiert (Oehlmann et al. 2007). In Fischen kann die Modulation der Aromatasen CYP19a und CYP19b zu einer Beeinflussung der hormonellen Gleichgewichtslage führen, wobei die Aromataseregulation eine Schlüsselrolle in der sexuellen Differenzierung und der Reproduktion einnimmt (Cheshenko et al. 2008). Ebenfalls spielt sie eine wichtige Rolle in der Organogenese (Eggen 2008). Auch die Quantifizierung des Dottervorläuferproteins Vitellogenin in männlichen Fischen stellt einen Biomarker für östrogene und antiandrogene EDC-Belastungen dar (Hansen et al. 1998; Sumpter und Jobling 1995; Ankley et al. 2001; Routledge et al. 1998). Als Vorstufe des Eidotters ist Vitellogenin in juvenilen und männlichen Individuen nicht vorhanden, kann aber durch hormonaktive Stoffe induziert werden. Ebenfalls kann die Vitellogeninproduktion durch endokrine Substanzen in weiblichen Fischen unterdrückt werden. Eine Vitellogenin-Induktion kann durch einen ELISA bestimmt werden (Tyler et al. 1999) oder die, durch Transkription des Gens Vitellogenin entstandene m-RNA kann auch durch reverse Transkription mittels PCR quantifiziert werden (Lattier et al. 2002). Der Vitellogenin-Test wird in der Literatur als *In vivo*-Test Endpunkt angegeben, wenn er hingegen an primären Hepatozyten durchgeführt wird, handelt es sich um einen *In vitro*-Test Endpunkt (Jobling und Sumpter 1993; Hollert et al. 2005). Die Übergänge der Teststrategien sind fließend (Abb. 2).

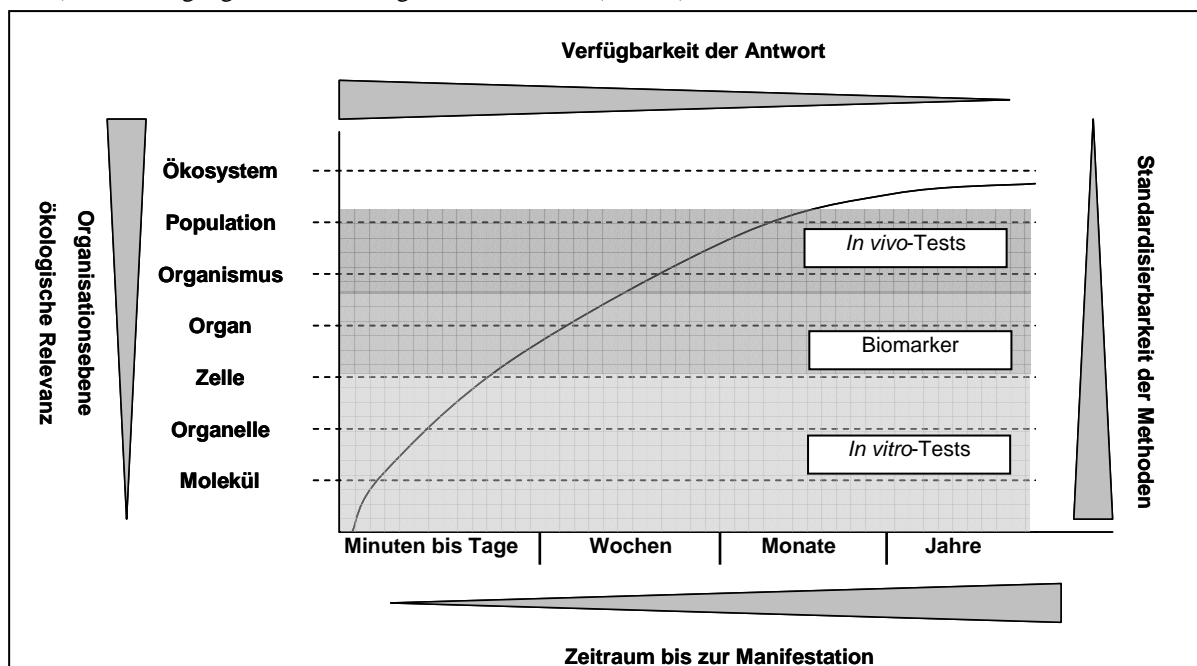


Abb. 2 Ebenen der ökotoxikologischen Wirkungen und mögliche Dauer der Manifestation von Effekten in Abhängigkeit der Untersuchungsmethodik; verändert nach (Braunbeck 1993)

Eine Kombination von Biomarkern wie die m-RNA Induktion von Vitellogenin aus Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) die *in situ* in Kläranlagenausläufen exponiert wurden mit dem *In vitro*-Yeast Estrogen Screen Assay (YES, mit humanem Östrogenrezeptor (ER)), HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney cells mit ER) und der *In vitro*-Vitellogenininduktion in primären Regenbogenforellen-Hepatozyten, ergab gute Korrelationen für die Bewertung einer östrogenen Aktivität (Pawlowski et al. 2003). Die Sensitivitätsreihenfolge der Testverfahren schwankte jedoch für die einzelnen Erfassungszeiträume. Eine gute Übersicht beispielsweise über den Biomarker Vitellogenin in Fischen und deren primären Hepatozyten bieten die Arbeiten von Hutchinson und Navas (Hutchinson et al. 2006; Navas und Segner 2006), diese zeigen aber auch die grosse Variationsbreite der Antwort.

Als weitere Biomarker können benutzerdefinierte Genexpressionsanalysen einzelner Gene oder von tausenden von Genen mittels cDNA Arrays (Microarrays, Genchips) genutzt werden. Beispielsweise sind Genexpressionsanalysen unter Östrogeneinfluss an primären Hepatozyten der Regenbogenforelle möglich und erlauben deren Einsatz als *In vitro*-Modell in der Ökotoxikologie (Schreer 2005). Der MolDarT (Muncke 2008) ermöglicht eine selektive Aussage über die Induktion von östrogenabhängigen Genen in Fischeiern vom Zebraäbrbling (*Danio rerio*), z.B. für Biomarker Vitellogenin. Eine signifikante Vitellogenininduktion konnte für östrogene Substanzen (bei 25 ng/l für 17-alpha-Ethinylestradiol und 2,7 µg/l für 17-beta-Estradiol) nachgewiesen werden (Muncke et al. 2006). Ein Vergleich der Sensitivität für Einzelsubstanzen wurde tabellarisch zusammengefasst (siehe Tab. 1 und 2).

Ebenso gibt es Microarray-Verfahren mit *In vivo*-Ansätzen, die beispielsweise die Expression von 2000 Genen in adulten *Pimephales promelas* erfassen und zeigen, dass mindestens 71 Gene durch 17-beta-Estradiol Einfluss reguliert werden (Larkin et al. 2007). Ein ähnliches Verfahren gibt es für den Zebraäbrbling (*Danio rerio*) (Martyniuk et al. 2007). Auch Medaka (*Oryzias latipes*) wurde mit Hilfe von Microarrays androgene Substanzen untersucht, wobei insgesamt 1815 Gene von 9379 untersuchten Genen hoch oder runterreguliert wurden und 50 diagnostische Gene identifiziert werden, die charakteristische Genexpressionsprofile unter Androgeneinfluss aufweisen (Leon et al. 2008). Genexpressionsanalysen haben den Vorteil, dass diverse endokrine (östrogen, androgen, thyroidal usw.) und andere chronische Effekte (z.B. Neuro- oder Immunotoxizität) gleichzeitig untersucht werden können und so ein gesamtheitliches Bild einer Expositionswirkung entsteht. Geeignete Auswertungsmethoden werden entwickelt, um solch umfangreiches Datenmaterial aus Microarrays zu interpretieren. Da es sich um Effekte auf Transkriptionsebene handelt, bedarf es auch noch weiterer Anstrengungen diese Effekte auf höhere organismische Ebenen zu übertragen und als zuverlässige Indikatoren für die vielfältigen Ausprägungen einer endokrinen Disruption zu nutzen. Ebenfalls ist bei solchen Extrapolationen zuvor die ökotoxikologische Relevanz der Aussage abzuklären, was oft schwierig ist, da die Variabilitäten bei einigen Biomarkern art- undentwicklungsspezifisch sehr ausgeprägt sein können. Es müssen daher noch eindeutige Bewertungskriterien und Endpunkte eingeführt werden.

2.3.3 *In vivo*-Testverfahren

In vivo-Testverfahren sind biologische Testverfahren, bei denen Organismen in definierter Art und Anzahl eingesetzt werden, um deren Reaktion auf eine Exposition zu messen. Sie nutzen den gesamten Organismus und basieren meist auf der Erfassung von Veränderungen an morphologischen, physiologischen oder verhaltensbiologischen Merkmalen. *In vivo*-Tests besitzen eine sehr hohe Aussagekraft, da sie die Reaktion des gesamten Organismus auf Umwelteinflüsse integriert erfassen (Spengler 2001). Leider zeichnen sich *In vivo*-Tests je nach Testparameter meist durch eine längere Versuchsdauer, besonders bei chronischen Tests (siehe Abb. 4) und einen hohen Arbeitsaufwand aus. Um ein valides Ergebnis zu erhalten muss eine ausreichende Anzahl an Versuchstieren parallel getestet werden.

Kommt es bei Umweltproben- als auch bei Einzelsubstanztestungen zu Überlagerungen von toxischen und hormonaktiven Effekten, sind in einigen Fällen Range-Finding-Versuche notwendig, da endokrine Effekte deutlich geringere Schwellenwerte aufzeigen können als verschiedene andere Effektparameter. Auch können meist nur wenige Konzentrationen oder Verdünnungstufen parallel getestet werden.

Den methodischen Nachteilen von *In vivo*-Tests steht eine direkte Interpretierbarkeit der Versuchsergebnisse für den Organismus, teilweise sogar für die Population, also insgesamt eine höhere ökologische Aussagemöglichkeit gegenüber. Prinzipiell ist es möglich mit *In vivo*-Ansätzen bei genügend langer Expositionszeit auch Effektkaskaden, verzögerte und chronische Effekte und Wirkungen von low-dose Substanzen nachzuweisen. Ebenso können Kombinationseffekte, sekundäre Effekte und auch Metabolisierungseffekte angezeigt werden. Insgesamt können mehrere relevante Parameter einer organismischen Antwort über den Versuchszeitraum aufgenommen werden (Schäfers 2007) und verschiedene Wirkmechanismen erfasst werden. Bestimmte Substanzen wie Nonylphenol, können z.B. Biomarker wie die Vitellogenin-Induktion in Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) beeinflussen, aber wirken sich nicht direkt auf morphologische Parameter und Geschlechterverhältnisse aus (Ackermann et al 2002). Ebenfalls erweist sich eine Korrelation der Vitellogenin-Konzentrationen und der gonadosomatischen Indexes (GSI) in Fischen als schwierig, wie es an Goldfischen (*Carassius auratus*) gezeigt werden konnte (Li et al. 2008).

Im Gegensatz dazu konnte jedoch in diversen Arbeiten gezeigt werden, dass beispielsweise in reproduzierenden männlichen Dickkopf-Elritzen die VTG-Produktion gut mit Gonaden-Histopathologie und sekundären Geschlechtsmerkmalen korreliert (Weisbrod et al. 2007; Kunz et al. 2006; Harries et al. 2000; Miles-Richardson et al. 1999) und in reproduzierenden Weibchen auch mit der Fekundität, Gonaden Histologie und GSI übereinstimmt (Ankley et al. 2001; Kunz et al. 2006; Weisbrod et al. 2007). Zusätzlich zu den östrogenen Effekten können z.B. androgene oder antiöstrogene Effekte durch eine Verringerung des VTG-Levels in weiblichen Fischen oder auch mit einem Rückgang der Fekundität angezeigt und korreliert werden. Die Untersuchungsmöglichkeiten androgener und antiandrogener Substanzen wurden auch an heimischen Arten wie dem Rotaugen (*Rutilus rutilus*) bewertet (Ballegooy 2008). Bei der Anwendung für ein Umweltmonitoring sollte jedoch in Betracht gezogen werden, dass je nach untersuchter Art die Messparameter saisonalen Schwankungen im Reproduktionszyklus unterliegen können und möglichst heimische Arten verwendet werden sollten. Neuere Testverfahren, die sich derzeit in Validierung befinden, wie beispielsweise der Reproduktionstest mit der limnischen neuseeländischen Zwergdeckelschnecke (*Potamopyrgus antipodarum*), können reproduktionstoxische und hormonaktive Wirkungen durch Reduzierungen oder Stimulationen der Embryoproduktion anzeigen (Duft et al. 2007) und reagieren in umweltrelevanten Konzentrationen auf vielfältige androgene und östrogene Substanzen. Andere Schneckenarten wie *Marisa cornuarietis* oder *Nassarius reticulatus* reagieren ähnlich sensitiv und vermögen EDC-Wirkungen wahrscheinlich stärker über den Mechanismus der Aromatasehemmung und die Ausbildung von Imposéstadien anzuzeigen. Auch könnten andere Invertebraten, wie beispielsweise Bachflohkrebse (z.B. *Gammarus pulex*) in Zukunft für die Untersuchung von endokrinen Disruptoren genutzt werden, und erste Studien zeigen, dass Endpunkte wie Geschlechterverteilung, Gonadenhistologie, Vitellogenin und das Heat-Shock Protein 90 (Gagné et al. 2005; Gross et al. 2001; Schirling et al. 2006; Watts et al. 2002) geeignet sein könnten. Die Verwendung von Invertebratenarten, welche eine Schlüsselrolle im aquatischen Ökosystem ausüben erlaubt es die ethisch umstrittenen Fischttests einzuschränken und gleichzeitig Biotests durchzuführen, die ökologisch relevant sind. Eine Erfassung möglichst vielfältiger Endpunkte in *In vivo*-Tests mit unterschiedlichen Arten ist daher sinnvoll und sollte unter möglichst standardisierten Bedingungen durchgeführt werden.

Mögliche Endpunkte zur Erfassung von endokrin wirksamen Substanzen mit *In vivo*-Tests:

- Physiologische Veränderungen: Vitellogeninkonzentrationen (Ackermann et al. 2002; Hansen 2000; Kang et al. 2002; Kunz et al. 2009a; Li et al. 2008; OECD No. 60 2006; Routledge et al. 1998; Segner et al. 2003), 11-Keto-Testosteron (Schäfers 2007), Spiggin-Konzentrationen (Katsiadaki et al. 2002) oder andere physiologisch relevante Hormonkonzentrationen (Kloas 2002), Thyroidstoffwechsel (Kloas 2002), Aromatasehemmung (Cheshenko et al. 2008; Oehlmann et al. 2007).
- Morphologische Veränderungen der primären oder sekundären Geschlechtsmerkmale: Geschlechtsdifferenzierungen (Duft et al. 2007; Kloas et al. 1999; OECD No. 60 2006), sekundäre Geschlechtsmerkmale (Kunz et al. 2006; Weisbrod et al. 2007), Gewicht und Körpermaße der Geschlechtsorgane

(Duft et al. 2007; Schulte-Oehlmann et al. 2001; Weisbrod et al. 2007), gonadosomatischer Index (GSI) (Baatrup und Junge 2001; Belt et al. 2004; Kang et al. 2002; Li et al. 2008; OECD No. 60 2006; Segner et al. 2003), Gonadenhistologie (Kunz et al. 2006; Miles-Richardson et al. 1999; Pawlowski et al. 2004; Weisbrod et al. 2007) oder Spermienzählungen (Baatrup und Junge 2001), Intersexstadien (Metcalf et al. 2001; Schulte-Oehlmann et al. 2001), Impossexstadien (Duft et al. 2007; Oehlmann et al. 2007)

- Reproduktionstoxikologische Parameter:
Ei-oder Embryozahlen (Ankley et al. 2001; Duft et al. 2007; Kang et al. 2002; Kunz et al. 2006; Weisbrod et al. 2007), Befruchtungshäufigkeiten (Ankley et al. 2001; Kang et al. 2002; Schäfers und Wenzel 2000), Larvalentwicklungen (Andersen et al. 2001; Ankley et al. 2001; Kloas 2002; Nishimura et al. 1997), Reproduktionserfolge (Kang et al. 2002; Preston et al. 2001), Geschlechterverhältnisse (Ackermann et al. 2002; Kloas et al. 1999; Kloas 2002) und Paarungsverhalten von Fischen (Coe et al. 2008; Watts et al. 2001).

Auf *In vivo*-Testverfahren wird teilweise in den Tab. 5 und 6. Eine wesentlich umfangreichere Zusammenstellung der *In vivo*-Testverfahren befindet sich in (Moltmann et al. 2007) und soll hier nicht aufgeführt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Problematik einer Testauswahl nach einer Literaturrecherche

Eine Bewertung der *In vivo*-Testverfahren erweist sich als schwierig, zumal einzelne *In vivo*-Verfahren aufgrund des experimentellen Aufwands und der meist geringeren Verbreitung eine geringere Datendichte aufweisen. Ebenfalls können die *In vivo*-Sensitivitäten aufgrund der Unterschiedlichkeit der Referenzsubstanzen und der Vielzahl der untersuchten Endpunkte nicht vergleichend dargestellt werden. Zusätzlich erschwerend kommt hinzu, dass es international Bestrebungen gibt, bewilligungspflichtige Tierversuche zukünftig wo möglich zu vermeiden und durch nichtbewilligungspflichtige *In vivo*-Versuche mit Invertebraten, oder mit *In vitro*-Testsysteme zu ersetzen. Ein Anliegen dieser Arbeit ist es diese Entwicklungen zu berücksichtigen und wo möglich bewilligungsfreie Testsysteme vorzuschlagen.

Auch bei der Auswahl und Bewertung möglicher geeigneter *In vitro*-Verfahren sind nach einer Literaturrecherche viele Fragen offen (siehe Tab. 1 und 2). An Beispielen mit subzellulären und zellulären *In vitro*-Testverfahren, sollen hier kurz die Probleme für eine Einschätzung von Testverfahren erörtert werden, die zunächst nicht ersichtlich sind:

- *Beispiel 1* Jedes zelluläre Testverfahren hat durch seine Sensitivität gegenüber hormonaktiven Wirkungen und durch seine Empfindlichkeit gegenüber toxischen und konzentrationsbedingten Effekten einen eigenen Arbeitsbereich in dem es Wirkungen anzuzeigen vermag. **Abbildung 3** zeigt eine typische östrogenrezeptorvermittelte Antwort eines zellulären Systems, die in bestimmten Konzentrationsbereichen zytotoxischen oder konzentrationsbedingten Effekten unterliegt.
Konsequent sollten bei der Anwendung von zellulären Verfahren toxische Effekte sorgsam von östrogenen Effekten unterschieden werden und nur in Konzentrationen und Verdünnungen benutzt werden, in denen die Zellvitalität kaum beeinflusst wird (Kinnberg 2003). Eine Probenverdünnung reduziert die Toxizität, aber ebenfalls die Möglichkeit östrogene Effekte zu detektieren. Molekulare Rezeptorbindungsassays können daher zuverlässige Alternativen bei sich überlagernden Effekten sein. Der Enzyme-Linked-Receptor Assay (ELRA) zählt zu den einfachsten, und mit einer Versuchsdauer von ca. 4 Stunden, auch zu den schnellsten subzellulären Testsystemen (Hock und Seifert 1998). Eine störende Überlagerung mit zytotoxischen Effekten oder mikrobiellen Kontaminationen wie in zellulären oder organismischen Systemen wird vermieden (Kase et al. 2007). Eine Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten ist bei keinem zellulären (z.B. YES oder ER-Calux) und

subzellulären Testverfahren, welche auf einer Rezeptorbindung basieren vollständig möglich, auch wenn es dafür experimentelle Ansätze gibt.

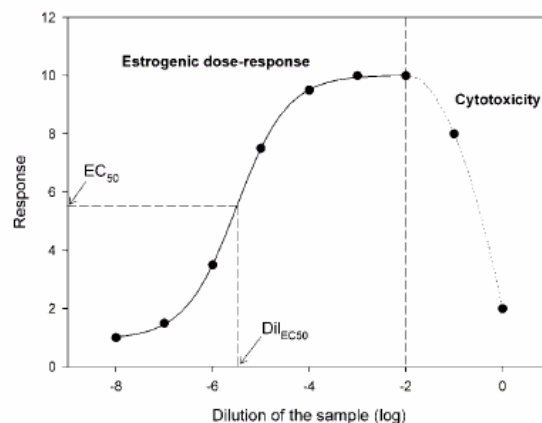


Abb. 3 Östrogenabhängige Antwort eines zellulären Biotests, aus (Leusch 2008)

So wird in zellulären Systemen der überwiegende Effekt zwischen östrogenen und antiöstrogenen Rezeptorbindung angezeigt, d.h. antiöstrogene Substanzen können östrogene Wirkstoffe in Umweltprobenmessungen überlagern, ohne dass es zu einer Zellantwort kommt. In subzellulären Rezeptorbindungsassays (z.B. ELRA) kann hingegen alles, was an den Rezeptor bindet detektiert werden, unabhängig von seiner Wirkrichtung. Eine Anwendbarkeit auf Umweltproben mit verschiedenen Rezeptorbindungstests mit ausreichender Sensitivität konnte ebenfalls wie in anderen Studien bestätigt werden (Kase et al. 2008, Leusch et al. 2006, Murk et al. 2002). Rezeptorbindungsassays wie der ELRA sind ausreichend sensitiv, um sie in bestimmten Umweltprobenbewertungen ohne Aufkonzentrierungen in hohen Verdünnungsstufen anzuwenden (Kase et al. 2008). Ob dies auch für Oberflächengewässerproben zutrifft ist unklar und wird derzeit an der University of Virginia in einer grossen Messkampagne (ca. 200 Proben) geprüft. Die Sensitivität kann durch eine luminometrische Variante aber nochmals um den Faktor 5 gesteigert werden (Global Water Research Coalition 2006). Die Sensitivität für Einzelsubstanzen liegt jedoch meist unter denen von empfindlichen zellulären Systemen (siehe Tab. 1 und 2). Aufgrund der fehlenden Wirkrichtungsunterscheidung eignen sich subzelluläre Rezeptorbindungsassays eher als Alternativen zu zellulären Systemen, wenn zytotoxische oder mikrobielle Belastungen in Umweltproben vorliegen.

- *Beispiel 2* In der Regel werden nach einer Literaturrecherche die bereits seit längerer Zeit etablierten Testverfahren auffallen, über die entsprechend umfangreich publiziert worden ist. Ein gutes Beispiel stellt der E-Screen oder auch MCF-7-Zelllinienproliferationstest dar, der sehr empfindlich östrogene Wirkungen an humanen Brustkrebszellen nachzuweisen vermag (Andersen et al. 1999; Gutendorf und Westendorf 2001; Folmar et al. 2002; Körner et al. 1997). Der MCF-7-Test als Proliferationstest wurde erstmalig 1995 von A. Soto in (Soto et al. 1995) mit 17-beta-Estradiol als Referenzsubstanz beschrieben. Auch konnte in dieser Studie bereits ein Screening für mehrere umweltrelevante östrogene Substanzen durchgeführt werden. Nur vereinzelte Literaturquellen weisen auf die methodischen Grenzen im Umgang mit diesem Testverfahren hin, wozu die Berücksichtigung initialer Zelldichten, die Verwendung hormonfreier oder hormonhaltiger Kulturmedien gehören. Beide Faktoren wirken sich erheblich auf die Sensitivität des Testverfahrens aus (Rasmussen und Nielsen 2002). Auch besteht bei längerem Einsatz von Zelllinien die Gefahr der Bildung von Subclonen, die veränderte Eigenschaften aufweisen. In einer Studie zum Interlaborvergleich des MCF-7-Tests bei Verwendung des gleichen Zellstammes und des gleichen Protokolls, traten Abweichungen für den EC_{50} bis zu einem Faktor von 70 auf (Andersen et al. 1999). Ein weiterer negativer Aspekt für den Einsatz des MCF-7-Testes als ökotoxikologisches Testsystem ist der

direkte Einfluss von zytotoxischen Schadstoffen auf die Proliferationsrate, die als Maß für östrogene Aktivität dient (Kase 2004). In einigen Fällen ist es daher nicht möglich, zytotoxische Effekte von den hormonaktiven Wirkungen getrennt zu detektieren. Es bleibt zu prüfen, ob Weiterentwicklungen des MCF-7-Tests wie der MVLN-Test (Belt et al. 2004, Gutendorf und Westendorf 2001), bei dem ein Reportergensystem integriert wurde, unabhängiger von zytotoxischen Effekten östrogene Effekte anzeigen kann, z.B. indem Wachstums- und Induktionseffekte miteinander verrechnet werden.

Für ein Umweltmonitoring sind z.B. Testverfahren zu bevorzugen, die mit möglichst nativen Proben arbeiten können, damit die natürlichen Expositionspfade, aber auch der Einfluss der Bioverfügbarkeit berücksichtigt werden können. Erfreulicherweise gibt es vergleichende Studien (Kase et al. 2007; Legler et al. 2002; Leusch et al. 2006; Leusch 2008; Murk et al. 2002), die es sich zur Aufgabe gemacht haben, die für eine Anwendung relevanten Kriterien zu identifizieren und zu bewerten. Am besten eignen sich Studien, die sowohl mit Einzelsubstanz- als auch mit Umweltprobenuntersuchungen gearbeitet haben.

Tab. 3 Stärken und Schwächen von 5 *In vitro*-Testverfahren; aus (Leusch 2008)

Legende: - = unterdurchschnittlich; + =mäßig, ++ = gut, +++ = ausgezeichnet. (a) Der KBlueC lief nur in einem Labor. (b) Octylphenol verursachte ein Verschleppungsproblem auf der Mikrotiterplatte

Assay	YES	ER-CALUX	MELN	KBluc	E-Screen
Analysis of model compounds	+++	+++	++	(+++)	+++
Analysis of environmental samples	-	+++	+	(++)	+++
Ease of use	++	+	+	+(a)	+
Simple training	++	-	-	-(a)	-
Low cost	+++	-	-	+	+
Sensitivity	-	+++	++	++	++
Robustness	-(b)	++	++	++	++
Reproducibility	++	+++	+	(?)	++
Maturity (widespread use)	+++	++	+	+	+++
High-throughput screening	+++	+++	+++	+++	+++
Quick results	++	++	++	++	-

Eine Bewertung des E-screens oder des MCF-7-Proliferationstest kann je nach gesammelten Erfahrungen durchaus unterschiedlich ausfallen (**Tab. 3**).

- Beispiel 3: Auch die Einschätzung des YES, als nicht sensitives Verfahren, kann durch Literaturangaben widerlegt werden, da er schon mehrfach erfolgreich für Umweltprobenbewertungen eingesetzt wurde (siehe Tab. 1 und 2). Die hier verwendeten YES-Verfahren hatten eine Nachweisgrenze von 3,5 und 5 ng/l 17-beta-Estradiol, andere YES-Verfahren können um den Faktor 10-50 sensitiver (zum Vergleich z.B. Vermeirssen et al. 2006). Es ist davon abhängig welches YES-System in welcher Modifikation verwendet wird. Der Anspruch eines Anwenders an ein Testverfahren hängt aber stark vom Anwendungszweck ab.

3.2 Erfassung relevanter Anwendungskriterien für biologische Testsysteme

Nach dieser Literaturrecherche wurde aufgrund der oben geschilderten Problematik bei der Auswahl der Testverfahren ein Fragebogen entworfen, der möglichst unterschiedliche Anforderungen an ein Testverfahren abfragt und damit einen schnellen Überblick über mögliche Anwendungsgebiete bietet. Auch konnten so verstärkt Informationen zu *In vivo*-Verfahren erfragt werden, deren Beurteilung sich aufgrund einer oftmals geringeren Datendichte und einer höheren Komplexität der Endpunkte als schwieriger erweist. Die Auswahl erfolgte nach dem Validierungsstatus und anhand von der durch Publikationen nachgewiesenen Umweltprobentauglichkeit mit entsprechender Sensitivität.

Aus 15 Testverfahren (5 *in vivo* und 10 *in vitro*) konnten 8 Verfahren der OECD erfasst werden und 3 von 5 *In vitro*-Verfahren aus dem GWRC-Report „Tools to detect estrogenic activity in environmental waters“ (Leusch 2008) wurden berücksichtigt. Zu einem Testverfahren wurde neben der Grundinformation eines Testverfahrens, die Sensitivität bzw.

auch der Arbeitsbereich, die Anwendbarkeit, die Standardisierbarkeit/Verfügbarkeit, der Aufwand, Kosten, Praktikabilität und die biologische und ökotoxikologische Relevanz bei versierten Anwendern abgefragt. Es wurden nur Personen mit ausgewiesener Expertise für die Befragung gewählt, daher war entscheidend ob diese schon eine Anzahl entsprechender Publikationen für diese Testverfahren vorzuweisen hatten oder eine aktive Mitwirkung in Gremien zur Biotestentwicklung (Validierung/Normung) bekannt war. Um die Subjektivität der Angaben zu reduzieren, wurde ein Verweis auf entsprechende Literaturquellen zur Stützung der Angaben oder kurze Begründungen gefordert, und es fand nach Eingang der Befragungsergebnisse eine Prüfung der Ergebnisse mit anderen Literaturangaben statt. Bei Fragen, Unklarheiten oder dem Verdacht auf Fehlinformation wurden durch Telefonate die kritischen Punkte erneut erörtert und es fand eine Anpassung oder ein Weglassen der Information statt. Da es sich um sensible Daten handelt, die sich im Rahmen von zukünftigen Projekten noch ein wenig revidieren können, wurde eine allgemeine Anonymisierung der Befragten bevorzugt. Trotz dieser Bemühungen um Objektivierung der Angaben und dem hohen Informationsgehalt der zur Verfügung gestellt wurde, sind subjektive Einflüsse nicht gänzlich auszuschließen, da jedes Verfahren nur einmalig erfasst werden konnte. Diese Abfrage stellt daher eine Erweiterung zum verfügbaren Wissen durch eine Literaturrecherche dar und kann ebenfalls als Orientierungshilfe zur Identifikation geeigneter Testverfahren für verschiedene Anwendungszwecke dienen.

Tab. 4 Bei Anwendern abgefragte Testverfahren und Endpunkte zur Erfassung hormonaktiver Wirkungen

Durch Kriterienprofile erfasste Testverfahren und deren Endpunkte zum Nachweis hormonaktiver und reproduktionstoxischer Wirkungen
In vivo-Verfahren:
1) FSA: Fish Screening Assay (erweitert) in OECD Validierung Biomarker (Vitellogenin; zusätzlich möglich 11-keto Testosteron); Reproduktionsparameter (Eizahl, Befruchtungsrate), optional: Histologie
2) XEMA: Amphibienmetamorphoseassay mit <i>Xenopus laevis</i> (erweitert) ab 04/09 als OECD-Guideline verabschiedet Endokrine Disruption des Schilddrüsensystems anhand von Entwicklungsstadien (morphologische Parameter), Schilddrüsenhistologie (Genexpression möglich)
3) Pa-Repro: Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> in OECD Prävalidierungsphase Embryonenzahl in der Bruttasche, die unter Einfluss von östrogenen/androgenen und reproduktionstoxischen Substanzen moduliert wird.
4) Dm-Repro: Daphnienreproduktionstest, bereits OECD validiert (TG 211) aber ohne endokrine Spezifität, Erweiterung geplant Überleben, Nachkommenzahl nach Guideline; Erweiterung für endokrine Effekte (vorgeschlagen): Geschlechtsverhältnis der Nachkommen
5) Chirotest: Chironomidentest, bereits OECD validiert (TG 218-219) aber ohne endokrine Spezifität, Erweiterung geplant Schlupfrate (Emergenz) u. Entwicklungsrate, Ausweitung der Testlänge auf 45 Tage, nkl. Reproduktiver Phase, zusätzliche Endpunkte: Anzahl Eistränge, Fruchtbarkeit der Eistränge, Lebensfähigkeit der Nachkommen
In vitro-Verfahren:
6) MVLN-Test Enzymaktivität nach hER abhängigen Reporter gentranslation in transfizierten MCF-7-Zellen
7) YES nach McDonnell Agonistische und antagonistische Rezeptorbindung am humanen ER α in rekombinant veränderten Hefezellen (BJ 3505)
8+9) YES/YAS nach Sumpter und nach Schultis/Metzger modifiziert Agonistische und antagonistische Rezeptorbindung am humanen ER α und AR in rekombinanten Hefezellen mit Lyticase katalisiertem Endverdau der Zellen
10) H295R Steroidgenese Assay, bereits OECD validiert und Bestandteil des EDSP Disruption der Steroidgenese von 17-beta-Estradiol und Testosteron
11+12) ER-Calux alpha, AR-Calux Luminometrische Messung einer humanen ER α und AR rezeptorvermittelten Antwort von T47D rekombinant veränderten Brustkrebszellen
13) E-screen, MCF-7-Proliferationstest Induktion der Zellproliferation von Mammakarzinomzellen humanen Ursprungs (MCF-7-Zellen)
14) Enzyme-Linked-Receptor-Assay, ELRA Rezeptorbindungsassay, der agonistische und antagonistische Rezeptorbindung am humanen ER α erfasst
15) AWACCS Biosensor, der Multianalytbestimmungen ermöglicht Multianalyt-Immunoassay für aquatische Schadstoffe

Einige vielversprechende *In vitro*- und *In vivo*-Tests wurden aus folgenden Gründen nicht in die Abfrage miteinbezogen. Für Verfahren wie der T47D-K-BlueC (Wilson et al. 2004) und den OECD validierten TA-Assay (Takeyoshi 2006) wurden Anfragen gestartet, es erfolgte jedoch kein Rücklauf. Für *In vitro*-Fischrezeptor Tests konnte kein Anwender/Experte gefunden werden, der die Abfrage beantwortete, was darauf hinweist, dass diese Test im Moment kaum Verbreitet und in Anwendung sind. Ähnlich scheint es sich bei *In vitro*-Vitellogenin Induktionstests mit Fischhepatozyten zu sein. Beide fischbasierten *In vitro*-Testarten könnten jedoch in Zukunft für eine Umweltmonitoring von Interesse sein (OECD 2009, in prep.) (Tab. 4). *In vivo*-Testverfahren, wie die in OECD-Validierung befindlichen Fish Short Term Reproduction Assay oder der Fish Sexual Development Test (siehe Tab. 5 und 6) wurden aufgrund des enormen Arbeitsaufwandes und dem damit verbundenen Verlust an Praktikabilität für eine Untersuchung von Gewässern nicht für die Abfrage in Betracht gezogen. Folgende Testverfahren wurden durch die Abfrage erfasst.

3.2.1 Ergebnisse der Kriterienabfrage der Testverfahren

Zunächst wurden Fragen zur ökotoxikologischen Relevanz und Eignung des Testverfahrens gestellt:

- Ist das Testverfahren aus Ihrer Sicht als Screening-Verfahren geeignet, um in Umweltproben hormonaktive Potentiale anzuzeigen?
- Für wie geeignet halten Sie den ermittelten Endpunkt, um hormonaktive Wirkungen in Gewässern für ein breites Organismenspektrum anzuzeigen?
- Ist das Testverfahren aus Ihrer Sicht als Monitorverfahren geeignet, um bestimmte hormonaktive Wirkungen in Gewässern im Routineinsatz anzuzeigen?

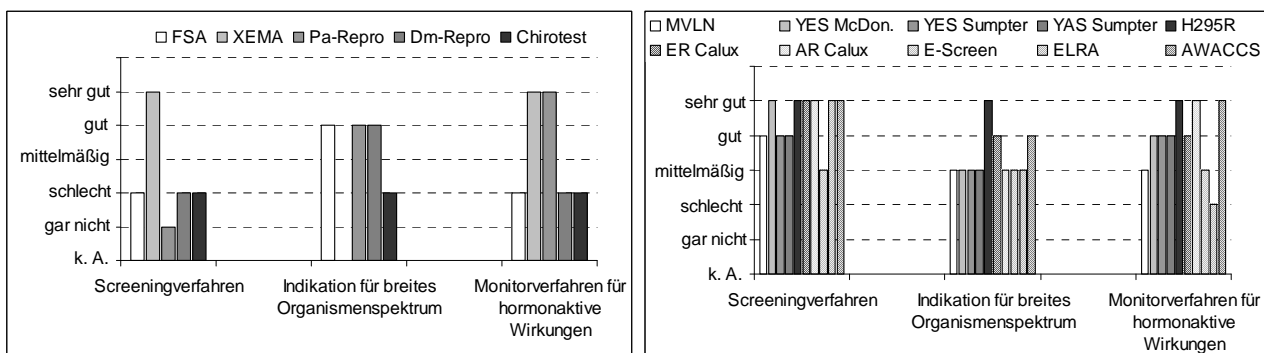


Abb. 4 und 5 Ökotoxikologische Einschätzung von Testverfahren für hormonaktive Wirkungen

Die *In vivo*-Verfahren wurden bis auf den XEMA (Xenopus Metamorphosis Assay) im Allgemeinen als schlechtere Screening-Verfahren bewertet als die meisten *In vitro*-Verfahren. So wurde z.B. 4 x angegeben, dass die *In vivo*-Verfahren zu aufwändig seien und 2 x wurde eine eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse angegeben. Eine Einschätzung der Eignung als Monitorverfahren fiel für die *In vivo*-Verfahren unterschiedlich aus. Die Befragung zum Indikationswert des Endpunktes für ein breites Organismenspektrum wurde für die *In vitro*-Verfahren mindestens als mittelmäßig eingeschätzt, die Angaben für die *In vivo*-Verfahren variierten hingegen von schlecht bis gut. Eine Einschätzung des XEMA wurde mit sehr gut für Vertebraten angegeben. Da der Anteil der Vertebraten in aquatischen Systemen variieren kann wurde die Angabe nicht gewertet. Der Chironomidentest wurde diesbezüglich als schlecht bewertet, da eine Übertragbarkeit auf Insekten beschränkt ist. Allerdings kann der Insektenanteil gewässerspezifisch relativ hoch liegen. Während *In vitro*-Verfahren eher für Kurzzeiteexpositionen geeignet sind, so können *In vivo*-Verfahren Langzeiteffekte erfassen.

3.2.2 Erfassung des Zeitaufwandes der Testverfahren

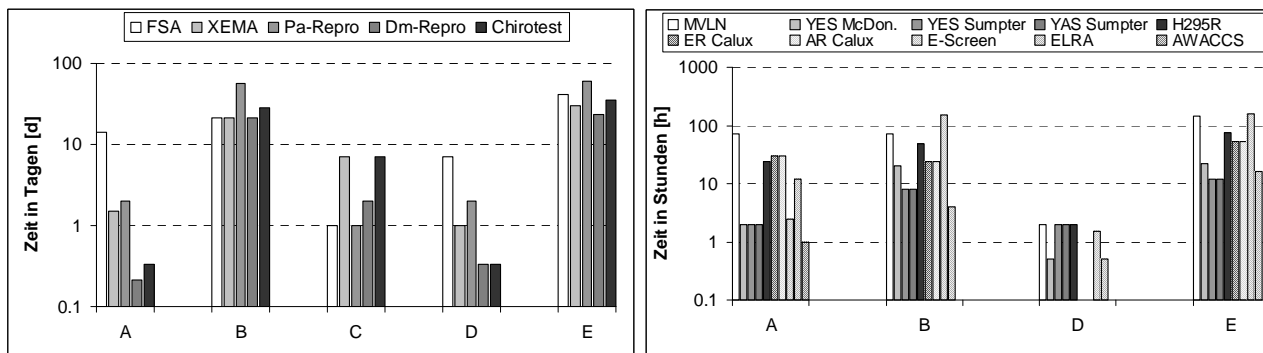


Abb. 6 und 7 Zeitaufwand von Testverfahren für hormonaktive und reproduktionstoxische Wirkungen; A=Vorbereitungszeit, B=Versuchsdauer, C=Vortestungen, D=Auswertungszeit, E=Gesamtzeitbedarf. Der Zeitaufwand für Vortestungen=C bei den *In vitro*-Test wurde mit 0 angegeben und daher nicht dargestellt

Die *In vivo*-Verfahren benötigen je nach gemessenem Endpunkt oft einen wesentlich höheren Zeitaufwand als die *In vitro*-Verfahren. Bei den *In vivo*-Verfahren benötigt der Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* den längsten Gesamtzeitbedarf, gefolgt vom Fisch-Screening-Assay. Bei den *In vitro*-Verfahren benötigten erwartungsgemäß (siehe Tab. 1 und 2) der E-Screen und der MVLN-Test den größten Zeitaufwand. Bei den YES/YAS Verfahren wurde der zeitliche Aufwand der Übernachtskultur (Vorbereitungszeit) nicht berücksichtigt, damit verlängert sich der Gesamtzeitbedarf dieser Verfahren noch einmal um 16-18 h. Parallel zum Zeitaufwand wurde auch der geschätzte Arbeitsaufwand befragt.

3.2.3 Erfassung des Arbeitsaufwandes der Testverfahren

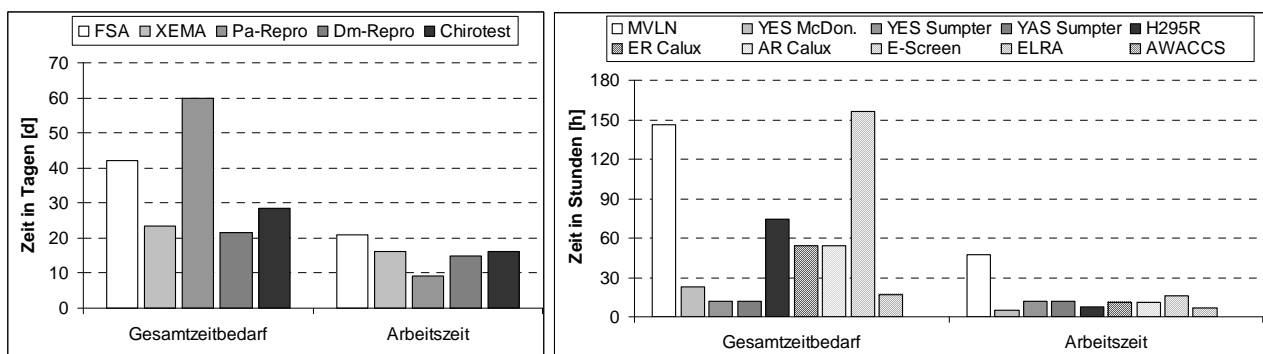


Abb. 8 und 9 Arbeitsaufwand von Testverfahren für hormonaktive und reproduktionstoxische Wirkungen

Auch der Arbeitsaufwand lag für die *In vivo*-Verfahren erheblich höher als für die *In vitro*-Verfahren. Jedoch zeigte sich, dass der Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* bei dem längsten Gesamtzeitbedarf mit dem geringsten Arbeitsaufwand angegeben wurde. Bei den *In vitro*-Verfahren wurde der MVLN-Test, der eine Weiterentwicklung des E-Screens ist, als wesentlich arbeitsintensiver (47 h im Vergleich zu 16 h) beschrieben. Neben der Arbeitszeit wurden die Materialkosten für einen Versuchsansatz und die gesamten Installationskosten (Messgeräte, Versuchsapparatur, Testkomponenten) abgefragt, um den Versuch in einem nicht ausgestatteten Labor erstmalig zu installieren.

3.2.4 Erfassung der Materialkosten von Testverfahren

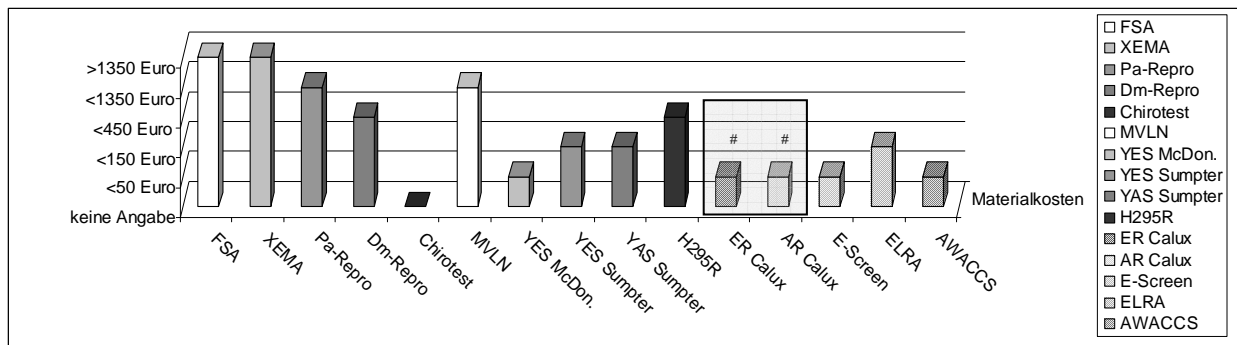


Abb. 10 Materialkosten von Testverfahren für hormonaktive und reproduktionstoxische Wirkungen für einen Versuchsansatz; kommerzielle Verfahren wurden mit einem # gekennzeichnet, die anfallenden Kosten sind bei den Anbietern zu erfragen

Die Materialkosten für *In vivo*-Verfahren wurden im Mittel höher eingeschätzt als die der *In vitro*-Verfahren. Der FSA und der XEMA belegten die höchsten Kostenklassen. Bei den *In vitro*-Verfahren zeigte sich der MVLN-Test als sehr aufwendig. Der H295R Steroidgenese Assay wurde bezüglich der Materialkosten gleichwertig mit dem Daphnienreproduktionstest eingeschätzt, der die geringste Kostenklasse bei den *In vivo*-Verfahren belegte. Für den Chironomidentest lag keine Einschätzung vor. In einem Versuchsansatz mit *In vitro*-Verfahren werden in der Regel mehr Substanzkonzentrationen, bzw. Probenverdünnungen getestet als bei *In vivo*-Verfahren (nicht gezeigte Daten), was sich zusätzlich günstig auf den Kostenaufwand pro Probe auswirkt.

3.2.5 Erfassung der Installationskosten von Testverfahren

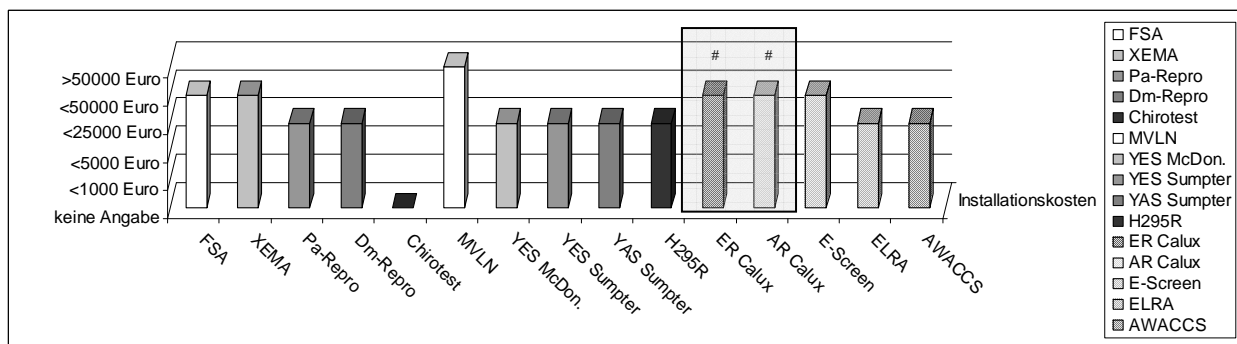


Abb. 11 Installationskosten (Messgeräte, Versuchsapparatur, Testkomponenten) von Testverfahren für hormonaktive und reproduktionstoxische Wirkungen, die bei einer Erstinstallation in einem Labor anfallen; kommerzielle Verfahren wurden mit einem # gekennzeichnet, die anfallenden Kosten sind bei den Anbietern zu erfragen

Für die Installationskosten zeigen die *In-vitro* Verfahren eine ähnliche Klassenverteilung wie die *In vivo*-Verfahren, was wahrscheinlich auf die relativ hohen Kosten bei der Anschaffung der Mikrotiterplattenlesegeräte für luminometrische und photometrische Messungen zurückzuführen ist. Erneut wurde der MVLN-Test als sehr kostenintensiv eingeschätzt.

3.2.6 Erfassung der Sensitivitäten der Testverfahren

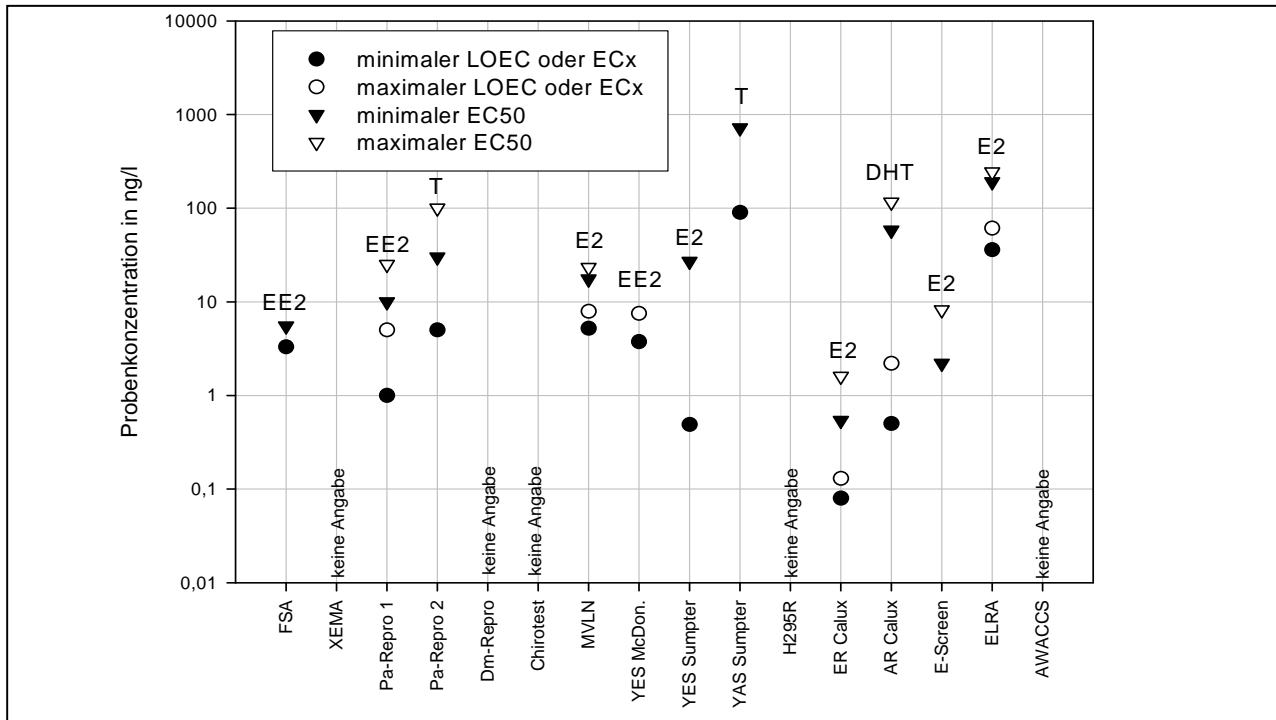


Abb. 12 Sensitivitätsvergleich von Testverfahren für hormonaktive Wirkungen aus der Abfrage. Minimale und maximale LOEC oder EC_x-Werte (X=10 oder 20) sowie EC₅₀-Werte wurden für verschiedene Testsubstanzen dargestellt. T=“Testosteron“; DHT=“Dihydrotestosteron“; E2=“17-beta-Estradiol“, EE2=“17-alpha-Ethinylestradiol“

Für 5 Testverfahren lagen keine Angaben vor. Bei den *In vitro*-Verfahren kann folgende Sensitivitätsreihung für 17-beta-Estradiol anhand der EC₅₀ vorgenommen werden ER-Calux<E-Screen<MVLN<YES Sumpter< ELRA. Der ER-Calux zeigt auch die geringsten LOEC-Werte und scheint für 17-beta-Estradiol eine hohe Sensitivität aufzuweisen. Aufgrund der Lückenhaftigkeit der Datenangaben und der Unterschiedlichkeit der verwendeten und auch verwendbaren Testsubstanzen lassen sich nur begrenzte Schlussfolgerungen ableiten. So kann z.B. der YAS nach Sumpter nicht mit dem AR-Calux verglichen werden, da unterschiedliche Substanzen getestet wurden. Testverfahren wie der XEMA oder der H295R Steroidgenese Assay arbeiten aufgrund ihrer Wirkmechanismen mit anderen Referenzsubstanzen. Sowohl *In vitro*- als auch *In vivo*-Verfahren ermöglichen , den Nachweis östrogenen Substanzen im unteren ng/l Bereich.

3.2.7 Erfassung der Anwendungsbereiche der Testverfahren

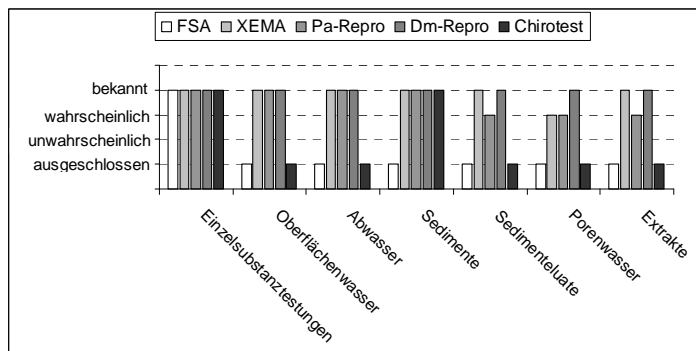


Abb. 13 Anwendungsbereiche der *In vivo*-Verfahren

Der FSA und der Chironomidentest wurden in Ihrer Anwendbarkeit sehr eingeschränkt dargestellt, wo hingegen die anderen Verfahren als sehr flexibel für verschiedene Anwendungsbereiche bewertet wurden. Leider konnten nur die Anwendungsbereiche für die *In vivo*-Verfahren vergleichend dargestellt werden. Einige *In vitro*-Verfahren (z.B. die ER und AR- Calux-Systeme, bestimmte YES-Verfahren oder der H295R Steroidgenese Assay) testen Oberflächenwasser oder Abwasserproben erst nach Extraktionen. Dies kann erstens auf Überlagerungen mit möglichen zytotoxischen Effekten zurückzuführen sein oder weil mit Extraktionen oftmals auch Aufkonzentrierungen verbunden sind, die z.B. eine zu starke Verdünnung von Wachstumsmedien durch die Probe umgehen. Ebenfalls sind für wirkungsbezogene Analyseansätze Extraktionen absolut notwendig. Andere Verfahren wie der ELRA oder die modifizierten Sumpter YES/YAS-Systeme können mit nativen Wasserproben arbeiten und sind ausreichend sensitiv und robust um bestimmte Umweltprobenbewertungen durchzuführen. Eine Ringtestung mit nativen oder dotierten Proben unterschiedlicher Belastungsqualität könnte wertvolle Informationen zu den möglichen Anwendungsbereichen liefern.

3.2.8 Bewertung der Standardisierbarkeit, Verfügbarkeit und Verbreitung von Testverfahren

Den Anwendern und Entwicklern wurden folgende Fragen zur Standardisierbarkeit und Verfügbarkeit gestellt:

- Wie gut schätzen Sie die Standardisierbarkeit ein?
- Wie gut sind Testkomponenten und/oder Testorganismen in gleichbleibender Qualität über das gesamte Jahr kommerziell erhältlich?
- In wie vielen Laboren wissen oder vermuten Sie wird derzeit das Testverfahren angewendet?

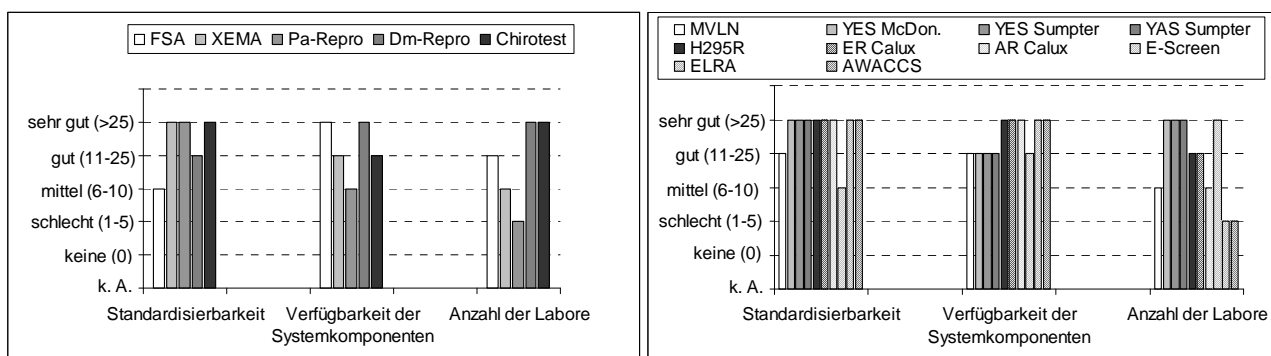


Abb. 14 und 15 Standardisierbarkeit, Verfügbarkeit und Verbreitung von Testverfahren für hormonaktive und reproduktionstoxische Wirkungen. Die Zahlen stehen für die geschätzte Anzahl der Labore in denen das Testverfahren angewendet wird.

Die Standardisierbarkeit der *In vitro*- und *In vivo*-Verfahren wurde relativ hoch eingeschätzt. Nur der E-Screen und der FSA wurden als mittelmäßig zu standardisieren bewertet. Da sämtliche dargestellten *In vivo*-Verfahren sich in Normungen oder Prävalidierungen für die OECD befinden oder bereits genormt sind, war dieses Ergebnis zu erwarten. Die Verfügbarkeit der Systemkomponenten wurde ebenfalls relativ hoch eingeschätzt. Eine mittelmäßige Bewertung erhielt der Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Für diesen Test wurden auch reproduktionszyklische Schwankungen eingeräumt, zu denen die Testung östrogenen (Frühjahr) und androgenen Substanzen (Spätsommer und Herbst) aufgrund der dann natürlicherweise hohen bzw. niedrigen Embryonenzahl nur eingeschränkt möglich ist (Gefahr falsch negativer Befunde). Eine Gefahr von falsch negativen und falsch positiven Befunden wurde auch für die anderen Testverfahren abgefragt (nicht gezeigte Daten), führte aber zu Verwirrungen in der Beantwortung da der Ausgangspunkt für eine solche Aussage zuvor nicht geklärt wurde. Diese Angabe ist auch von den betrachteten Wirkmechanismen abhängig und wird in der Diskussion aufgegriffen. Eine Einschätzung der Verbreitung der Testverfahren konnte gut mit den Angaben in den Literaturquellen in Zusammenhang gebracht werden. Je nach Bekanntheitsgrad und

Validierungszustand der Testverfahren wurde auch die geschätzte Anwendungshäufigkeit angegeben. Testverfahren wie der Daphnienreproduktionstest oder der Chironomidentest, die bereits OECD validiert sind und z.B. zur Pflanzenschutzmittelbewertung benutzt werden, sind gegenüber in der OECD-Validierung befindlichen Verfahren weiter verbreitet. Beide Verfahren werden derzeit gezielt für die Untersuchung von hormonaktiven Substanzen erweitert (siehe Tab. 4). Ältere Verfahren wie der E-Screen besitzen aufgrund ihrer Bekanntheit eine häufigere Anwendung als neuere Verfahren. Die starke Verbreitung der YES/YAS-Systeme (siehe Tab. 1 + 2) konnte auch in dieser Abfrage gezeigt werden. Der Schwerpunkt liegt auf den Sumpter/Routledge-Varianten, was nicht differenziert aufgeführt wurde. Eine tabellarische Zusammenfassung der Gesamtergebnisse der Kriterienprofile befindet sich in Tab.9.

Die Validierung und Normung (Standardisierung) von Testverfahren sind wichtige Werkzeuge, um die methodischen Grenzen und die Anwendbarkeit von Testverfahren zu beschreiben. Auch wenn der Zeitaufwand für diese Prozesse beachtlich sein kann, so wird eine Erhöhung der Akzeptanz und Verbreitung erreicht und bietet die Möglichkeit Testverfahren in regulative Bewertungsverfahren zu implementieren. Daher werden diese Aspekte im nachfolgenden Abschnitt behandelt.

3.2.9 Rolle der Validierung und Normung für Testverfahren

Der Sinn von Normen besteht darin eine Vergleichbarkeitsbasis oder einen Massstab zur Bewertung einer Vergleichbarkeit bereitzustellen. Angaben zu einer statistischen Aussagesicherheit, der Standardisierbarkeit, Automatisierbarkeit und Reproduzierbarkeit von Testverfahren lassen sich oft nur in aufwändigen Ringversuchen mit mehreren Laboratorien genauer treffen. Es ist auch nicht immer möglich eine einheitliche Standard Operating Procedure (SOP) bei der Untersuchung gleicher Proben in unterschiedlichen Laboratorien zu verwenden, da die apparative Ausstattung sehr variieren kann. Größere Ringversuche (> 6–7 Laboratorien) können helfen, die kritischen Anwendungsschritte in SOPs zu identifizieren (Leusch 2008). Methodische Schwachpunkte können über einen Validierungsprozess genauer identifiziert werden. Die OECD beschäftigt sich mit Chemikalienprüfung, ISO und CEN mit der Prüfung von Umweltproben, wobei valide Tests für Chemikalienprüfungen auch für Umweltprüfungen interessant sein können. Neben einem Erkenntnisgewinn über die Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit eines Testverfahrens können im Verlauf der Normierung von Testverfahren vielfältige Vorteile erzielt werden; verändert nach (Pluta 2008b):

- Sicherheit, dass die Methoden auf andere Laboratorien übertragbar und valide sind
- Aufmerksamkeit aller interessierte Gruppen für das Testverfahren, unabhängig von einer wirtschaftlichen Leistungsfähigkeit und sprachlichen Fähigkeiten
- Nationaler Transfer internationaler Standards
- Vermeidung redundanter Arbeit und unnötiger Konkurrenzentwicklung
- die Ergebnisse die mit diesem OECD validierten Test erlangt werden müssen von allen Mitgliedsstaaten akzeptiert werden
- Möglichkeit der Berücksichtigung bei der Festlegung von Gesetzen
- Interessensausrichtung mehrerer unabhängiger Gruppen auf ein gemeinsames Ziel
- Standardisierte und für den Verwendungszweck akzeptierte Methoden
- Vergleichbare und gerichtsfeste Ergebnisse, die weltweit erhoben und bewertet werden können, womit auch internationale Vergleiche möglich sind
- Standardisierte und validierte Methoden, auch als Werkzeug der Qualitätssicherung und der formalen Akkreditierung
- Nutzung vorhandener Netzwerke als Plattformen für wissenschaftliche Diskussionen und zur Ermittlung weiteren Entwicklungsbedarfs
- Möglichkeit prä- und co-normative Forschung anzustossen, z.B. über drittmittelgeförderte Forschungsprojekte

Allerdings werden personelle und materielle Kapazitäten über einen längeren Zeitraum gebunden, wobei ein Teil der Aktualität der Untersuchungsinteressen verloren gehen kann. Besteht jedoch eine funktionierende Arbeitsvorschrift, so kann eine ISO oder CEN-Normung innerhalb von 2–3 Jahren erreicht werden. OECD Validierungen können bei entsprechender Eignung durch Me-Too-Validierungen abgekürzt werden. Das Sortiment älterer genormter Methoden wächst, womit die Möglichkeit einer Verdrängung innovativer und moderner Testverfahren besteht. Ist ein Testverfahren einmal genormt, so ist es unabhängig von seiner Aussagekraft besser verfügbar als ein nicht genormtes Testverfahren.

Auch die Akzeptanz von validierten und normierten Testverfahren kann unterschiedlich ausfallen, OECD-Guidelines können sogar bei der Wahl der verwendeten Organismen Ermessensspielraum lassen, hingegen DIN und ISO-Normen weitgehend festgelegter in den Methoden sind. Ein aktueller Vergleich der ISO und OECD-Methoden befindet sich in (OECD No.99 2008). Validitäts- und Gültigkeitskriterien, die Messunsicherheit, sowie die Beschreibung von Störungen und die Festlegung von Anwendungsbereichen sind elementare und obligatorische Bestandteile der Normung. Daher sollten Verfahren, die eine Umweltbewertung ermöglichen einen Normungsprozess durchlaufen, um eine sichere und übertragbare Aussage treffen zu können. **Tabellen 5 und 6** sollen einen Eindruck vermitteln, wie vielfältig und unterschiedlich die zu erfassenden Endpunkte für die Identifikation hormonaktiver und reproduktionstoxischer Wirkungen sein können.

Tabelle 5 und 6 Auswahl an Testverfahren für hormonaktive und fortpflanzungsrelevante Wirkungen, die sich in OECD Validierung befinden oder für die bereits OECD-Guidelines bestehen. Diese Tabelle erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit sondern zeigt die Vielseitigkeit für Testansätze der Validierungen bei der OECD. 8 der in der Tabelle aufgeführten Testverfahren wurden durch eine Kriterienprofilabfrage erfasst

Organismus/ System	Name	Endpunkte	Organisationslevel	Versuchdauer	Guideline/ Validierungsstatus
Säugertests					
Nager	Two Generation Reproduction Toxicity study	Fortpflanzungsverhalten bis zur F2-Generation, pathologische und histopathologische Geschlechtsmerkmale, Gewicht und Wachstum	organismisch / Population	> 56-70 d	OECD 416
Nager	One Generation Reproduction Toxicity study	Fortpflanzungsverhalten, Pathologische und Histopathologische Geschlechtsmerkmale, Gewicht und Wachstum	organismisch	> 56-70 d	OECD 415
Nager	Hershberger assay	androgene und antiandrogene Wirkung mit und an kastrierten Ratten-und Mäusemännchen, Gewicht des Musculus levator ani, der Samenblase und der ventralen Prostata	teilorganismisch / organismisch		
Nager	Uterotrophic assay	Uterusgewicht-und wachstum von Ratten-und Mäuseweibchen wird nach Exposition bestimmt und damit östrogene und antiestrogene Aktivität bestimmt	teilorganismisch / organismisch	>3-7 d	OECD 440
Aquatische Vertebratentests					
Fisch Fathead Minnow, <i>Pimephales promelas</i> Zebraquärling, <i>Danio rerio</i> Medaka, <i>Oryzias latipes</i> Sheepshead Minnow, <i>Cyprinodon variegatus</i>	Fish, Full Life-Cycle/Two generation Test	kompletter Lebenszyklus mit zahlreichen Endpunkten (Überleben, Wachstum, Reproduktion) Plasma-Vitellogenin, sekundäre Geschlechtsmerkmale, Gonadenhistologie, Geschlechterverhältnis besitzt gute endokrine Spezifität	organismisch / Population	6-7 Monate	im OECD-Arbeitsplan, Prävalidierungsaktivitäten in USA, JP, DE
Fisch Zebraquärling, <i>Danio rerio</i> Medaka, <i>Oryzias latipes</i> Fathead Minnow, <i>Pimephales promelas</i>	Fish Sexual Development Test	erweiterter Early Life Stage Test + Sexualdifferenzierung wird ausgedehnt auf die Detektion von (anti-)östrogenen und (anti-) androgenen und aromatasehemmenden Substanzen	organismisch	60-90 d	in OECD Validierung basierend auf OECD 210
Fisch z.B. Zebraquärling, <i>Danio rerio</i> Medaka, <i>Oryzias latipes</i> Fathead Minnow, <i>Pimephales promelas</i> Regenbogenforelle, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fish, Early Life Stage Test, ELST	die frühen Lebensstadien Schlupfrate, Mortalität, Deformationen, Wachstum, besitzt aber keine endokrine Spezifität	organismisch	30-90 d	OECD 210
Fisch Zebraquärling, <i>Danio rerio</i> Medaka, <i>Oryzias latipes</i> Regenbogenforelle, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fish, Juvenile Growth Test	Wachstumsverhalten juveniler Fische in exponentieller Wachstumsphase besitzt aber keine endokrine Spezifität	organismisch	ca. 28 d	OECD 215
Fisch Zebraquärling, <i>Danio rerio</i> Fathead Minnow, <i>Pimephales promelas</i> Medaka, <i>Oryzias latipes</i>	Fish, Screening Assay (FSA)	Plasma- oder Leber-Vitellogeninkonzentration auch Messung von 11-Ketotestosteron und Histopathologie der Gonaden, gonadosomatischer Index (GSI) und Eizahlbestimmung möglich	teilorganismisch / organismisch	21 d	in OECD Validierung
Fisch Fathead Minnow, <i>Pimephales promelas</i> und andere	Short-term Reproduction Assay	wie FSA + Eizahl + Histologie	teilorganismisch / organismisch	>21 d	Validierungsbeiträge von USA, die diese Variante dem FSA vorziehen (-> komplexe Verhandlungen auf OECD- Ebene)
Fisch Stichling, <i>Gasterosteus aculeatus</i>		Spigging-Protein			catch-up Validierung mit OECD- Einbindung durch UK/SW
Fisch Zebraquärling, <i>Danio rerio</i>	Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages, Fischeitertest	Embryotoxizität, Fischeier werden exponiert und nach 48 h wird das Überleben erfasst, keine endokrine Spezifität	organismisch	48 h	OECD 212 und DINENISO 15088
Amphibien Südafrikanischer Krallenfrosch <i>Xenopus laevis</i>	Amphibian Metamorphosis Assay (AMA) oder (XEMA)	Verzögerung oder Beschleunigung der Entwicklung . (NF-Stadien, Hinterbeinlänge, Körperlänge, Gewicht) Schilddrüsenhistologie (Genexpression möglich),	organismisch	21 d	OECD draft TG in abschließender Kommentierung, Verabschiedung voraussichtlich 2.Q 2009

Organismus/ System	Name	Endpunkte	Organisationslevel	Versuchdauer	Guideline/ Validierungsstatus
Invertebratentests					
Mollusken Zwergdeckelschnecke, <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Embryonenzahl in der Bruttasche, die durch estrogene und androgene Substanzen moduliert werden kann	organismisch / Population	4-8 Wochen	in Prävalidierung, auf OECD-Ebene entsteht z.Zt. ein Detailed Review Paper zu Molluskentests,
Crustaceen <i>Daphnia magna</i>	Daphnienreproduktionstest	Überleben und Reproduktionsfähigkeit, Erweiterung für Geschlechterverhältnisse geplant	organismisch / Population	21 d	OECD 211
Mysidien Schwebegarnelle, <i>Mysidopsis bahia</i>	Two generation test	keine Angaben	organismisch		Validierung nur in den USA mangels Ressourcen in anderen OECD-Ländern, aber mit Zustimmung und Begleitung der OECD-Gremien
Chironomiden <i>Chironimus riparius</i>	Chironomidentest	Mortalität, Emergenz der Mücken, Eizahl pro Gelege Schlupfverhalten und Geschwindigkeit, Erweiterung geplant	organismisch	4 Wochen	OECD 218, OECD 219
Copepoden <i>Amphiascus tenuiremis</i> und <i>Nitocera spinipes</i>	Full-Life-Cycle-Test	Entwicklung, Überleben; Befruchtungserfolg, Geschlechterverhältnisse	organismisch / Population	ca. 15 d und ca. 40 d	OECD-Validierung läuft
Copepoden <i>Acartia tonsa</i>	Full-Life-Cycle-Test	Entwicklung, Überleben; Befruchtungserfolg, Geschlechterverhältnisse	organismisch / Population	ca. 25 d	OECD-Validierung läuft
zelluläre Reporterassays					
HeLa-9903- humane Säugerzellen	TA-Assay	hER-HeLa-9903-Zelltest, Messung einer Luciferaseaktivität als Maß für die agonistische und antagonistische Induktion eines östrogen- abhängigen Reportergens für hER alpha, eine zweite transiente Variante wird ebenfalls validiert	zellulär		in Validierung für OECD 455 von CERI /MHLW
MELN-humane Brustkrebszellen	MELN-Assay	MCF-7-Zellen mit endogenem ER-alpha und Luciferasereportegen, Messung einer Luciferaseaktivität als Maß für eine östrogenabhängige Induktion	zellulär		Validierung erfolgte in 2008 durch EC/ECVAM
ER-Calux humane Brustkrebszellen	ER-Calux	Messung einer Luciferaseaktivität als Maß für die agonistische und antagonistische Induktion eines östrogen-abhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär	ca. 54 h	Validierung in 2008, Präsentation der Daten im 1. Quartal 2009 durch EC/ECVAM
T47D-Kbluc humane Brustkrebszellen	T47D-Kbluc	Messung einer Luciferaseaktivität als Maß für die agonistische und antagonistische Induktion eines östrogen-abhängigen Reportergens für hER alpha	zellulär		US-EPA Office of Research and Development möchte den Assay gerne retrospective validieren
AR TA (MDK-kb2)-Zelllinie	AR TA	Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay, der die agonistische und antagonistische Androgenrezeptorbindung anzeigt	zellulär		US-EPA Office of Research and Development möchte den Assay gerne retrospective validieren
AR-Calux humane Brustkrebszellen	AR-Calux	Messung einer Luciferaseaktivität als Maß für die agonistische und antagonistische Induktion eines androgen- abhängigen Reportergens für hAR	zellulär	ca. 54 h	Validierung in 2008, durch EC/ECVAM
Steroidgenese und Aromatase-Assays					
H295R-Adenokarzinomsäugerzellen	H 295R Steroidgenese Assay	Modulation der Steroidhormongenese, Aromatase modulation möglich	zellulär	48 -72 h	bereits validiert, Peer Review wir für das 2. Quartal 2009 erwartet
KGN-Säugerzellenn	Microsomal aromatase assay	Modulation der mikrosomalen Aromataseaktivität	zellulär/subzellulär		Validiert, Peer Review erfolgte am 12.01.2008
Rezeptorbindungsassays					
hER alpha –Rezeptorbindungsassay	Ceri-ER-alpha	Messung der Rezeptorbindung an der humanen ER-alpha Bindungsdomäne	molekular		USA führt eine internationale Kollaborationsstudie durch
hAR-Rezeptorbindungsassay mit humanem Androgenrezeptor	hAR-Assay	Messung der Rezeptorbindung an einem humanem Androgenrezeptor, der zuvor in <i>E. coli</i> exprimiert wurde	molekular		In Entwicklung von METI ca. 900 Substanzen getestet
rAR-Rezeptorbindungsassay mit Rattenrezeptor	rAR-Assay	Messung der Rezeptorbindung an einem Rattenandrogenrezeptor	molekular		Es bestehen einige Erfahrungen aus dem EU-Projekt ReProTect, Fortsetzung der Prevalidierung wird diskutiert
hrTR-Rezeptorbindungsassay mit humanen Thyroidrezeptoren	hrTR-Assay	Messung der Rezeptorbindung an TR alpha 1 und TR beta 1 der zuvor in voller Länge in <i>E.coli</i> exprimiert wurde	molekular		In Entwicklung von METI ca. 60 Substanzen getestet

4 Diskussion

4.1 Kriterien einer Testauswahl aus ökotoxikologischer und regulativer Sicht

Die unterschiedliche Handhabung von Begrifflichkeiten bei der Identifizierung und Auswahl geeigneter Kriterien für Testverfahren führt oft zu Verständnisproblemen und erschwert eine Findung gemeinsamer inhaltlicher Schnittmengen, die wie die folgenden Beispiele zeigen durchaus vorhanden sind.

Beispiel 1 Eignungskriterien für Testverfahren in der Ökotoxikologie

- Relevanz (besitzt einen Bezug und Bedeutung für das Ökosystem)
- Konstanz (hinreichende Wiederholbarkeit zu bestimmten Zeiten des Jahres)
- Empfindlichkeit (Effekte treten in umweltrelevanten Konzentrationen auf)
- Objektivierbarkeit (Mess- und Dokumentierbarkeit)
- Interpretierbarkeit (Rückschlüsse auf reale Freiland-Systeme möglich)
- Realisierbarkeit (vertretbarer zeitlicher, personeller, apparativer Aufwand)
- Standardisierbarkeit (definierte nachvollziehbare Versuchsbedingungen, die übertragbar sind)

Beispiel 2 Anforderungen an biologische und chemisch-physikalische Analysenverfahren als Überwachungsverfahren in der AbwV zu § 7a WHG und AbwAG (Pluta 2008a)

- Operationalität (Anzeige des Zieles der Abwasserbehandlungsmaßnahme direkt und sinnfällig über das Testergebnis)
- Reproduzierbarkeit (Standardisierte Testverfahren)
- Gerichtsfestigkeit (Festlegungen zur Durchführung des Verfahrens und zur Probenahme führen zu gerichtsfesten Ergebnissen)
- Rechtssicherheit (intrinsische Qualitätssicherung, Angaben zur Messunsicherheit)
- Sinnfälligkeit (Stellvertreterfunktion der Organismen oder eindeutige Wirkungserfassung)
- Optimale Testbedingungen (pH, Medien, Kulturbedingungen, Praktikabilität, Wirtschaftlichkeit)
- Kompatibilität mit EU-Recht, AbwV und AbwAG

Die Synthese von regulativen und ökotoxikologischen Sichtweisen ermöglicht die Entwicklung geeigneter Instrumente zur Umweltüberwachung, die eine belastbare Aussagekraft und eine hohe ökotoxikologische Relevanz besitzen können. Die grösste Schnittmenge bieten ökotoxikologisch relevante Verfahren, die sich methodisch soweit in Validierungsprozessen bewährt haben, dass die von ihnen abgeleiteten Aussagen zuverlässig sind. Dennoch sollten auch innovative Verfahren berücksichtigt werden, von denen anzunehmen ist, dass sie sich zukünftig in Validierungen und Standardisierungen behaupten können und die eine ökotoxikologische Aussagekraft bzw. zumindest eine Indikatorfunktion besitzen. Konzeptuelle Überlegungen zum Besorgnisvorbehalt, dem Vorsorgegedanken und dem Versursacherprinzip sollten einbezogen werden (Pluta 2008a).

Es ist recht unwahrscheinlich, dass ein Testverfahren alle Aspekte gleichermaßen gut bedienen kann. In einem wichtigen Diskussionsbeitrag von Vertretern der Industrie (Länge et al. 2006) zu einer Bewertung und Validität von toxikologischen und ökotoxikologischen Studien für regulatorische Fragestellungen wurden Hauptkriterien definiert, die dabei zu erfüllen sind. Als Hauptkriterien wurden Nachvollziehbarkeit, Plausibilität, Relevanz und Reproduzierbarkeit der Studien angeführt. Eine Nachvollziehbarkeit sollte erreicht werden, indem Relevanz und Fragestellung der Untersuchung klar definiert sind. Dennoch ergibt sich daraus die Problematik regulatorische Aspekte ausreichend flexibel und gleichzeitig gerichtsfest zu gestalten, damit eine Anwendbarkeit auch bei sich ändernden wissenschaftlichen und experimentellen

Ausgangssituationen erhalten bleibt. Die Reproduzierbarkeit als Wiederholungsgenauigkeit von Prüfergebnissen, kann nur bei entsprechender Einhaltung definierter bzw. standardisierter Versuchsbedingungen erreicht werden, womit große Anforderungen an *In vivo*-Ansätze gestellt werden, da diese stärker einer biologischen Variabilität unterliegen. Im Rahmen von Validierungs- und Standardisierungsprozessen wird auch die Reproduzierbarkeit untersucht. Dieser Punkt findet sich inhaltlich in allen Ansätzen wieder. Die Relevanz bezieht sich hier auf die Frage inwieweit der experimentelle Ansatz für die Prüfung geeignet ist. Dabei sind die unterschiedlichen Anwendungs- und Arbeitsbereiche der Testverfahren, aber auch eine ausreichende Spezifität in der Aussagemöglichkeit zu berücksichtigen. Auch dieser Punkt wird im regulatorischen Ansatz unter der Sinnfälligkeit berücksichtigt und trifft für die ökotoxikologische Betrachtung zu. So konnte belegt werden, dass einige experimentelle Ansätze gar keine direkte Zuordnung für endokrine Aktivität zulassen, da einfachere Wirkmechanismen zuvor nicht ausgeschlossen wurden, z.B. durch Eiersterblichkeit oder Fraßhemmung der Testorganismen durch Chemikalieneinfluss (Barata et al. 2004). Sowohl mit *In vitro*-, als auch mit *In vivo*- Ansätzen sollte es möglich sein allgemeintoxische Effekte von spezifischen Endpunkten zu unterscheiden, um zuverlässige Aussagen treffen zu können. Unter Plausibilität ist eine Überprüfung zu verstehen, ob die Ergebnisse in sich konsistent sind und ob sie mit denen anderer valider Studien im Einklang stehen (Länge et al. 2006). Es wird deutlich, dass es ungemein schwierig ist einen allgemeinen Konsens in wissenschaftlichen, regulatorischen und industriellen Ansprüchen zu finden, zumal bei allen theoretischen Übereinstimmungen die Praktikabilität unter wirtschaftlichen und wissenschaftlichen Gesichtspunkten nicht verloren gehen darf.

4.2 Einbeziehung der Abfrageergebnisse

Eine eigentliche Bewertung der Anwendbarkeit der Testverfahren ist an praktische Erfahrungen und im besten Fall an Inter-Labor-Vergleiche gekoppelt. Wie bereits erwähnt kann die Qualität und Eignung eines Testverfahrens nicht oder nur selten anhand einer Literaturrecherche abgeleitet werden. Aus diesem Grund wurde eine Abfrage ausgewählter Kriterien von unterschiedlichen Testverfahren (Tab. 7) bei versierten Anwendern und Entwicklern vorgenommen und ausgewertet. Diese soll als Orientierung für eine Entscheidungsfindung bei einer Wahl geeigneter Testverfahren dienen.

Tab. 7 Ergebnisse der Kriterienabfrage für Testverfahren zur Erfassung hormonaktiver und reproduktionstoxischer Wirkungen. (Bewertungsschlüssel: — = keine Angabe; 1=“gar nicht/trifft überhaupt nicht zu“; 2=“schlecht/trifft nur bedingt zu“; 3=“mittelmäßig/trifft zu“ 4=“gut/trifft im hohem Umfang zu“ 5=“sehr gut/absolut erfüllt“)

Kriterium / Testverfahren	Testverfahren															
	FSA	XEMA	Pa-Repro	Dm-Repro	Chirotest	MVLN	YES McDon.	YES Sumpter	YAS Sumpter	H29SR	ER Calux	AR Calux	E-Screen	ELRA	AWACCS	
Eignung als Screeningverfahren	2	5	1	2	2	4	5	4	4	5	5	5	3	5	5	
Indikation für breites Organismenspektrum	4	-	4	4	2	3	3	3	3	5	4	3	3	3	4	
Eignung als Monitorverfahren	2	5	5	2	2	3	4	4	4	5	4	5	3	2	5	
geringer Gesamtzeitbedarf	1	2	1	2	1	3	4	5	5	3	3	3	2	4	5	
geringer Arbeitsaufwand	1	1	2	2	1	2	5	3	3	4	4	4	3	5	5	
geringe Materialkosten	1	1	2	3	-	2	5	4	4	3	5	5	5	4	5	
geringe Installationskosten	2	2	3	3	-	1	1	3	3	3	2	2	2	3	3	
Normungsstand (5=ja; 3=in Normung, 1=nein)	3	3	3	5	5	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1	
Standardisierbarkeit	3	5	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5	3	5	5	
Verfügbarkeit der Systemkomponenten	5	4	3	5	4	4	4	4	4	5	5	5	4	5	5	
Verbreitung des Testverfahrens	4	3	2	5	5	3	5	5	5	4	4	3	5	2	2	
mittlere Klasse:	2,55	3,10	2,82	3,36	3,00	2,73	3,82	3,73	3,73	4,09	4,00	3,91	3,09	3,55	4,09	

Eine Auswahl von Ergebnissen der Umfrage kann hier dargestellt werden und ermöglicht einen Vergleich und eine Bewertung von insgesamt 15 Testverfahren (5 *In vivo*-Verfahren und 10 *In vitro*-Verfahren) für jeweils 7 Bewertungskategorien. Acht Verfahren der OECD konnten erfasst werden und 3 von 5 *In-vitro*-Verfahren aus dem GWRC-Report „Tools to detect estrogenic activity in environmental waters“ (Leusch 2008) wurden berücksichtigt.

Die Klasseneinteilung zum Arbeitsaufwand und Zeitbedarf erfolgte nach einer Rangfolge. Die 3 Verfahren mit dem größten Zeitbedarf erhielten Rang 1, die Verfahren mit dem 4.–6. größten Zeitbedarf Rang 2 usw.. Die Kriterien der Anwendbarkeit und Sensitivität der Testverfahren konnten hier nicht dargestellt werden. Genauere Informationen befinden sich im Ergebnisteil (siehe Abb. 4 bis Abb. 15).

Hierbei handelt es sich um eine Darstellung von Erfahrungswerten einzelner Anwender und Entwickler mit einem Testverfahren, die natürlich subjektiv beeinflusst sind. Gewisse Trends oder herausragende Stärken und Schwächen können jedoch aus dieser Tabelle abgeleitet werden. So fallen z.B. der E-Screen und der MVLN-Test durch relativ hohe Versuchszeiten und einem grossem Arbeitsaufwand für die *In vitro*-Verfahren auf. Im Mittelwert sind *In vivo*-Verfahren schlechter als Screening Verfahren bewertet und wiesen einen höheren Zeit- und Arbeitsbedarf, sowie höhere Materialkosten auf. Die Einschätzung des XEMA als sehr gutes Screening- und Monitor-Verfahren wirft Fragen auf, da es sich um ein recht zeit-, arbeits- und kostenintensives Verfahren handelt (siehe Abb. 6–9 und Tab. 7). Der durch die Abfrage erfasste AWACCS-Biosensor ermöglicht Multianalytbestimmungen für eine Auswahl von Umweltchemikalien im unteren ng/l Bereich und ist nicht für eine integrative Wirkungserfassung geeignet. Kein Testverfahren aus der Literaturrecherche und der Kriterienabfrage kann alle relevanten Wirkmechanismen zuverlässig, ausreichend sensitiv und praktikabel abbilden. Deshalb ist eine Kombination verschiedener Testverfahren zu empfehlen, bei der ihre unterschiedlichen Stärken eingebracht werden können. In eine ökotoxikologische Abwägung der Relevanz und der Sinnfälligkeit eines Testverfahrens sollte auch eine Berücksichtigung der Stellvertreterfunktion des gewählten Endpunktes eingehen.

4.3 Problematik und mögliche Lösungsansätze

Eine mögliche Vorgehensweise ist die Identifizierung von Testverfahren, die eine zuverlässige indikative Wirkung haben, z.B. *In vitro*-Systeme. Diesen können dann dann valide *In vivo*-Testverfahren nach- oder parallelgeschaltet werden, die populationsrelevante Aussagen zulassen. Für dieses Vorgehen sind zuvor Fragen zum Indikationswert von Testverfahren zu klären, verändert nach (Schäfers 2007):

- Gibt es Endpunkte mit spezifischem Indikationswert für bestimmte Wirkmechanismen?
- Sind indikative Endpunkte mit populationsrelevanten Endpunkten korreliert?
- Tendieren indikative Endpunkte zu falsch positiven oder falsch negativen Einschätzungen populationsrelevanter Aussagen?

Eine Aussage lässt sich nur durch die parallele Betrachtung von mehreren validen Testergebnissen unterschiedlicher Endpunkte für bestimmte Proben oder Einzelsubstanzen treffen und erfordert den Einsatz von populationsrelevanten *In vivo*-Tests (z.B. für Reproduktionstoxizität). Die US-EPA hat 1998 ein Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) einberufen, welches ein stufenweises Vorgehen für eine Bewertung der ca. 87000 kommerziellen Chemikalien und Umweltschadstoffe vorgeschlagen hat (Charles 2004). In Kooperation hat die OECD EDTA Task Force ein 5 stufiges Prüfprogramm entworfen, welches eine Bewertung von endokrinen Disruptoren ermöglicht (OECD Environment, Health and Safety Division Test Guidelines Programme 2005). Im Vorfeld der Entstehung wurden Berechnungen zur benötigten Anzahl der Versuchstiere mit einem Stufensystem durchgeführt. Dies erfolgte unter Berücksichtigung falsch positiver oder falsch negativer Testaussagen der unteren Bewertungstufen (Gray et al. 2002). Wie praktikabel und effizient dieses Prüfprogramm der OECD für die Einzelsubstanzbewertung beweisen wird ist offen. Mittlerweile befindet sich dieses Programm in einer komprimierten 2-stufigen Form in der Anwendung und wird noch ergänzt (US-EPA 2008). So wurde z.B. in der ersten Stufe im EDSP-Ansatz versucht die Unsicherheiten, die durch

in vitro zu *in vivo* Extrapolationen entstehen können, durch eine Kombination von verschiedenen Assays (*in vitro* und *in vivo*) mit unterschiedlichen Endpunkten zu adressieren. In einer zweiten Stufe werden dann die Chemikalien, die in der ersten Stufe Effekte verursachten, in Multi-Generations-Studien weiter bewertet. Es ist zu erwarten, dass hiermit ein hoher Erkenntnisgewinn über die Wirkweisen von Endokrinen Disruptoren damit verbunden sein kann, sofern die Daten zugänglich gemacht werden.

4.4 Stufenweises oder modulares Vorgehen

Ein stufenweises Vorgehen ermöglicht einerseits Flexibilität in der Durchführung, andererseits reduziert es den experimentellen Aufwand, da nur für Substanzen mit ausreichenden Verdachtsmomenten aufwändige *In vivo*-Verfahren angewendet werden müssen. Andererseits können low-dose, sekundäre sowie verzögerte und Langzeit-Effekte nur mit *In vivo*-Verfahren zuverlässig erfasst werden. Daher wäre ein modulares Vorgehen für die Bewertung Umweltproben (parallele Kombination von *In vitro*- und *In vivo*-Verfahren) aus ökotoxikologischer Sicht zu bevorzugen.

Verschiedene Studien, die vergleichend *In vitro*- und *In vivo*-Ansätze betrachten, zeigen Probleme in der Übertragbarkeit von *In vitro*-Befunden auf organismische *In vivo*-Antworten. So wurden verschiedene *In vitro*-Verfahren (rtER-YES und hER-YES) zusammen mit der Vitellogenin-Induktion in Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) anhand von verschiedenen UV-Filtern untersucht (Kunz et al. 2006). Sechs dieser UV-Filter waren *in vitro* in hohen Konzentrationen östrogen aktiv, zwei zeigten keine Aktivität *in vitro*. Für drei der sechs aktiven UV-Filter konnte auch *In vivo*-Östrogenität nachgewiesen werden, und UV-Filter ohne *In vitro*-Aktivität waren auch *in vivo* nicht östrogen, was darauf hinweist, dass die benutzten YES-Tests nicht zu falsch negativen Resultaten führten. Falsch positive Aktivitäts-Vorhersagen der *In vitro*-Tests könnten jedoch ein Problem sein, denn 3 der *in vitro* östrogenen UV-Filter zeigten *in vivo* keine östrogene Aktivität. Beide YES-Assays zeigten abhängig von der untersuchten Substanz ähnliche aber auch deutlich geringere Sensitivitäten als die organismische Vitellogenin-Induktion. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die YES-Systeme grundsätzlich auf die gleichen UV-Filter ansprachen, jedoch dabei unterschiedliche Sensitivitäten aufwiesen. Das rtER-YES-System, welches mit einem Regenbogenforellen-Östrogenrezeptor arbeitet, lag näher an der *In vivo*-Antwort, obwohl es unempfindlicher auf 17-beta-Estradiol reagierte, als das YES-Verfahren mit dem humanen Östrogenrezeptor.

Auch eine andere Studie, die mit YES-Verfahren und *In vivo*-Systemen mit Regenbogenforellen angewendet wurden, leitete eine Möglichkeit der Unterschätzung der *In vivo*-Antwort für tertiäre Abwasseruntersuchungen ab (Xie et al. 2004). Jedoch wurden die *In vitro*-Proben zuvor filtriert und anschließend extrahiert. Eine Veränderung des östrogenen Potentials durch eine Probenbehandlung kann für diese Studie daher nicht ausgeschlossen werden und zeigt die Notwendigkeit native Proben für Umweltprobenbewertungen zu verwenden. Die *In vivo*-Vitellogenininduktion variiert artspezifisch in Fischen recht stark (Hutchinson 2006). Es scheint davon abhängig zu sein mit welcher Fischart der Vergleich getroffen wurde. Wie entscheidend Östrogenrezeptoren für die Entwicklung und Funktion von aquatischen Organismen sind konnte anhand von Zebrafischen (*Danio rerio*) nachgewiesen werden, bei denen ein „Knock Down“ (Ausschaltung bestimmter Gene) erzeugt wurde (Fröhlicher 2008). Die rezeptorvermittelten Antworten tragen neben den anderen Wirkmechanismen (Aromatasehemmung, Modulation der Steroidgenese, usw.) einen Anteil an der endokrinen Disruption, daher sollten diese auch in einem modularen System berücksichtigt werden.

5 Welche Verfahren können für ein Umweltmonitoring verwendet werden? (Abb. 16)

Ein solch umfangreiches Prüfprogramm wie bei der OECD-EDTA Task Force ist für ein kontinuierliches Umweltmonitoring nicht zu realisieren, zudem die meisten der aufgeführten Testverfahren der OECD primär für Einzelsubstanztestungen ausgelegt sind. Für ein Umweltmonitoring sind einerseits Testverfahren zu bevorzugen, die mit möglichst nativen und chemisch-physikalisch unveränderten Proben arbeiten können, damit die natürlichen Expositionspfade, aber auch der Einfluss der Bioverfügbarkeit berücksichtigt werden können. Andererseits sollten (zyto)toxische Effekte getrennt von den hormonaktiven Wirkungen nachgewiesen werden können. Daher wäre eine

Kombination aus Testverfahren, die auf molekularer, zellulärer und organischer Ebene spezifische Endpunkte erfassen, welche gleichzeitig einen hohen Indikationswert für ein breites Organismenspektrum besitzen, wünschenswert.

Die Testkombination sollte also einerseits Systeme enthalten, die selektiv und wirkungsspezifisch sind, um das toxikologische Potential anzuzeigen. Andererseits muss eine Translation des toxikologischen Potentials in effektiv nachweisbare Effekte auf den Gesamtorganismus oder auf Populationen nachgewiesen werden, um eine vollständige ökotoxikologische Bewertung vornehmen zu können. Besonders die reproduktionstoxischen Effekte können populationsrelevant sein, wobei solche Effekte in Umweltproben sowohl durch hormonaktive als auch durch unspezifisch wirkende toxische Substanzen verursacht werden können. Der Anteil von hormonaktiven Wirkungen an einer Reproduktionstoxizität kann identifiziert werden, indem hormonaktive und subchronische allgemeintoxische Effekte parallel detektiert werden.

Generell werden gut untersuchte oder gut untersuchbare Arten für Testsysteme verwendet, wobei die Relevanz für heimische Ökosysteme nur selten berücksichtigt wurde. Daher ist der Entwicklungsstand der Testverfahren für bestimmte Arten (z.B. *Danio rerio*, *Xenopus laevis* oder auch *Potamopyrgus antipodarum*) wesentlich weiter als für heimische Arten, was die Auswahl der Testverfahren mit beeinflusst hat.

Eine umfangreiche Literaturrecherche zu Testsystemen für Gammariden ergab, dass es in dieser für Fließgewässer strukturell und funktionell bedeutenden Artengruppe einige EDC indikative Endpunkte für eine ökotoxische Risikobewertung in Oberflächengewässern geben könnte (Kunz et al. 2009b). Tests mit Invertebraten sind zu befürworten, um ethisch umstrittene Wirbeltiertests zu minimieren. Zudem machen Invertebraten mehr als 95% der bekannten Spezies aus (Oehlmann und Schulte-Oehlmann 2003), womit phylogenetisch konservierte Mechanismen vorrangig untersucht werden sollten, da diese auf ein größeres Artenspektrum übertragbar sind. Neben der Arten- und Biomasse-bezogenen Bedeutung der Invertebraten ist es wichtig zu erwähnen, dass Vertebratentests in Zukunft stark eingeschränkt werden sollen.

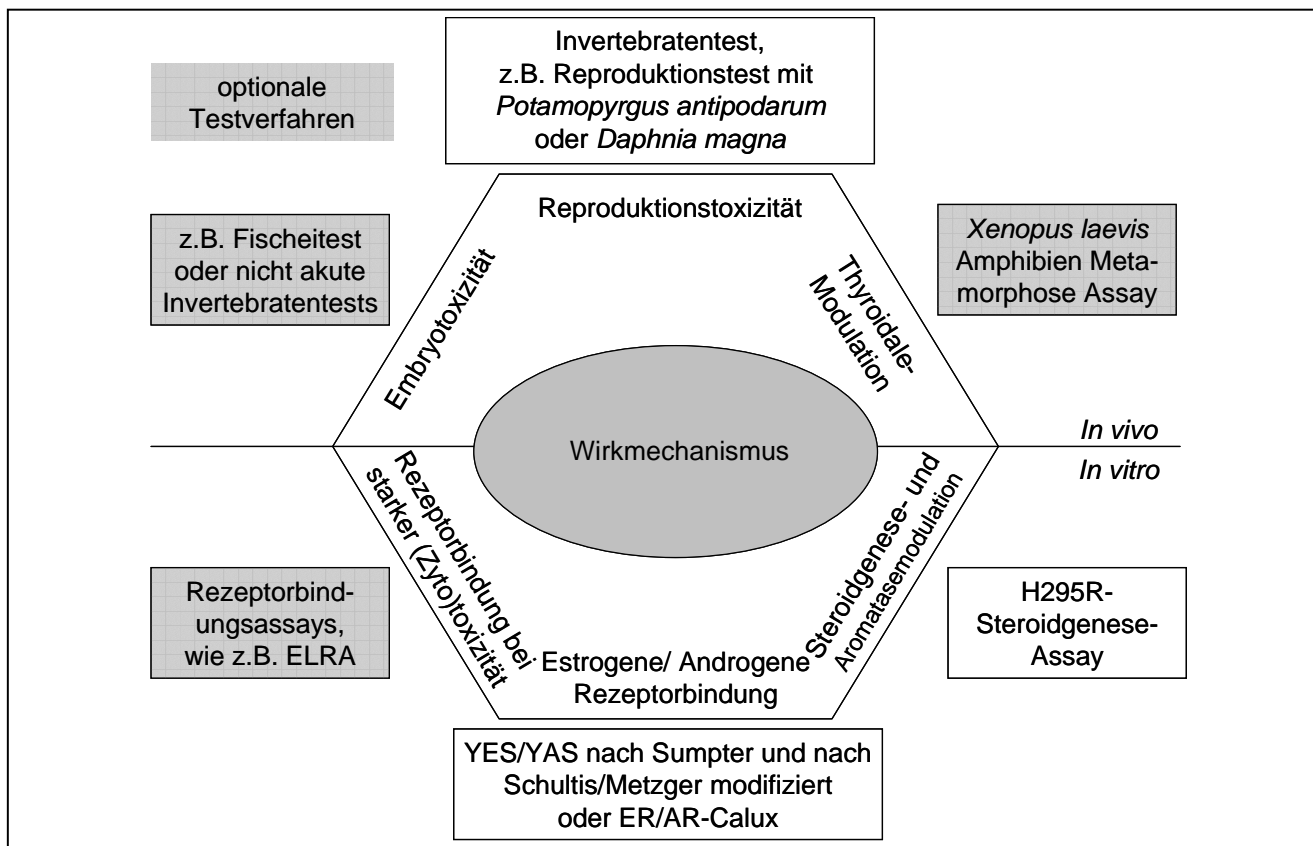


Abb. 16 Vorgeschlagene modulare Testverfahren zur Erfassung hormonaktiver und fortpflanzungsgefährdender Wirkungen, nach dem derzeitigen Entwicklungsstand

Allerdings sind die Mechanismen der endokrinen Disruption zwischen Invertebraten und Vertebraten derartig unterschiedlich, dass dadurch Schutzziele für Vertebratenpopulationen insbesondere für Fische verfehlt werden könnten. Andere Testverfahren die vertebratenrelevante Wirkmechanismen zuverlässig abdecken, sind ebenfalls notwendig. Es bleibt zu prüfen, inwieweit z.B. die zellulären Rezeptorbindungsassays oder der H295R Steroidgenese Assay dies vermögen.

Betrachtet man z.B. nur die Rezeptorbindungen an Östrogen- und Androgenrezeptoren, so gehen unter Umständen die Wirkmechanismen der Aromatasehemmung, der Beeinflussung des Thyroidstoffwechsels oder der Steroidgenese verloren, welche sich auf die hormonelle Gleichgewichtslage von Organismen auswirken können. Ebenso werden mögliche Bioaktivierungen oder auch Inaktivierungen durch Metabolisierungs- und Ausscheidungsreaktionen mit *In vitro*-Ansätzen oftmals nicht berücksichtigt. Dennoch ermöglichen *In vitro*-Ansätze als Screeningverfahren im Bezug auf eine schnelle und valide Datengenerierung (siehe Tab. 1 und 2 und Abb. 2) einen effizienten Weg um wirkmechanistische Betrachtungsweisen für potentielle endokrine Disruptoren zu untersuchen. Eine Abschätzung welche Mechanismen sich auch im neuroendokrinen System der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse manifestieren ist jedoch nicht möglich. Das hier vorgeschlagene modulare System hat versucht, unterschiedlichen Wirkmechanismen und unterschiedliche *In vivo*-Effekte zu berücksichtigen und in ihren Stärken zu kombinieren, die im Einzelnen diskutiert werden.

5.1 *In vitro*-Module

5.1.2 Molekulare Rezeptorbindungsassays/Biosensoren

Gerade die *In vitro*-Verfahren erlauben eine stärkere Trennung der spezifischen Antwort von allgemeintoxischen Effekten, da sie auf der zellulären Ebene die Möglichkeit besitzen entweder mit variablen Verdünnungstufen oder sogar mit Extrakten zu arbeiten. Teilweise können zytotoxische Effekte, bzw. eine Wachstumshemmung getrennt von der spezifischen Antwort angezeigt werden kann. Misst man direkt auf der molekularen Ebene, z.B. mit Rezeptorbindungsassays so fallen zytotoxische Überlagerungen sogar gänzlich weg. Auf die unterschiedlichen Arbeitsweisen von Rezeptorbindungsassays und zellulären Systemen wurde im Ergebnisteil eingegangen. Insgesamt sind Rezeptorbindungsassays zu bevorzugen, wenn starke zytotoxische Effekte oder mikrobielle Kontaminationen eine Anwendung der zellulären Assays behindern, da es dort zu Überlagerungen der Effekte kommen kann. Eine Probe muss dann in der Regel in einem zellulären Assay so stark verdünnt werden bis das Wachstum der Zellen Validitätskriterien erfüllt. Eine Probenverdünnung reduziert die Toxizität, aber ebenfalls die Möglichkeit estrogene Effekte zu detektieren (Kinnberg 2003). Rezeptorbindungsassays können als biochemische Verfahren daher gute Alternativen für eine Erfassung der agonistischen, als auch der antagonistischen Rezeptorbindung sein. Eigene Erfahrungen für Umweltprobenbewertungen liegen jedoch nur für den ELRA (Kase et al. 2007; Kase et al. 2008) vor, der mit dem humanen Östrogenrezeptor-alpha arbeitet und in hohen Verdünnungsstufen Rezeptorbindungspotentiale in wässrigen Umweltproben nachweisen kann. Eine Erweiterung um einen Androgenrezeptor wäre möglich und anzuregen, doch werden vielleicht zukünftig Biosensoren integral Rezeptorbindungen erfassen können, wie es neuere Studien aufzeigen (Fechner et al. 2008). Ebenfalls zu erwägen ist eine Kombination von ER/AR-Rezeptorbindungsassays der EDTA-Task Force (siehe Tab. 5 und 6), da OECD-Verfahren die Vorzüge einer OECD-Validierung mitbringen könnten. Inwieweit diese sich für Umweltprobenbestungen eignen müsste untersucht werden. Für eine Risikobewertung dürfen molekulare Rezeptorbindungsassays nicht als alleinige Testverfahren eingesetzt werden, da sie erstens nur auf der biochemischen Ebene Rezeptorbindungen anzuzeigen vermögen und zweitens keine Wirkrichtungsunterscheidung zulassen. Sie sollten daher als ergänzende Verfahren bei zyto(toxischen) Überlagerungen eingesetzt werden oder ermöglichen ein umfangreiches und kostenschonendes Probenscreening, um innerhalb kurzer Zeit belastete Hot-Spots zu identifizieren.

5.1.3 Zelluläre Rezeptorbindungsassays

Da zelluläre Biotests integrativ Rezeptorbindungen erfassen, ist eine Bewertung der Sensitivität der Biotests für Umweltmatrices komplexer als bei molekularen Rezeptorbindungsassays und erfordert Ringtestungen von nativen und dotierten Proben mit unterschiedlichen Testverfahren. Für den ER-Calux und den YES bestehen Vergleichsstudien mit Einzelsubstanzen, Oberflächenwasser-, Abwasser- und Sedimentextrakten, die eine gute Korrelation der ermittelten Östrogenitätswerte zeigen (Murk et al. 2002). Aufgrund des tieferen Detektionslimits und der daraus resultierenden geringeren benötigten Probenvolumina wurde der ER-Calux in dieser Studie für Umweltprobenbestungen als vorteilhaft dargestellt.

Eine weitere Einschätzung der Stärken und Schwächen des ER-Calux und bestimmten YES Verfahren befindet sich in Tab. 3. Als Grundlage wurden Einzelsubstanz-, Umweltproben- und dotierte Umweltprobenbestungen durchgeführt. Doch wurden in dieser Studie (Leusch et al. 2008) relativ unempfindliche YES-Varianten eingesetzt (mit Nachweisgrenzen von 3,5 und 5 ng/l 17-beta-Estradiol) und ebenfalls überwiegend mit Umweltprobenextrakten gearbeitet. Beide Vergleichsstudien empfehlen den ER-Calux als besonders sensitives Verfahren. Calux-Systeme arbeiten mit gentechnisch veränderten humanen Brustkrebszellen und werden derzeit von der OECD validiert. Sie zeigten auch unter den untersuchten *In vitro*-Systemen die höchste Sensitivität für Einzelsubstanzen (siehe Abb. 12) und relativ geringe Variationskoeffizienten für Intertest-Umweltprobenbestungen (< 20%). Nachteilig ist, dass diese Tests kommerziell angeboten werden und etwas aufwändiger in der Anwendung sind, was einer Verbreitung dieser Testsysteme entgegensteht. Als nicht kommerzielles Analogon zum ER-Calux wird eventuell der T47D-KbluC zukünftig von der OECD validiert, welcher von der US EPA befürwortet wird; eine ähnlich empfindliche Variante und bereits fast validiert ist der TA-assay (siehe Tab. 1 und 2 und Tab. 5 und 6).

Bei der Wahl eines zellulären Assays sollte ausserdem berücksichtigt werden, dass es z.B. bei einer Ozonung als Abwasserbehandlung zu einer Minimierung der östrogenen und einer Erhöhung der androgenen Rezeptorbindung kommen kann (Schwätter et al. 2007). Systeme, die parallel östrogene und androgene Rezeptorbindungen detektieren können sollten daher bevorzugt werden, zumal es keinen großen zusätzlichen Arbeitsaufwand bedeutet, beide Verfahren parallel zu nutzen. Auf der zellulären Ebene wird die Auswahl damit auf YES/YAS und ER/AR-Calux-Systeme begrenzt.

Anwendungsgrenzen der hefebasierten Systeme Eine grosse Verbreitung weisen die YES-Systeme auf, allerdings werden viele unterschiedliche Verfahren angewendet, wobei mehrere relativ unsensitiv auf Einzelsubstanzen reagieren (siehe Tab. 1 und 2), was die Auswahl eines geeigneten Verfahrens erschwert. Ein YES/YAS-System nach McDonnell befand sich ebenfalls schon in Normierungen des DIN Arbeitskreis „Endokrine Wirkungen“, doch unterliegt dort die YAS-Komponente stärker Wachstumsproblemen und zytotoxischen Effekten in Umweltproben (Kase 2004). Allerdings ist die YES-Komponente ausreichend robust um von der deutschen Bundesanstalt für Gewässerkunde zur ökotoxikologischen Bewertung von belasteten Sedimenten eingesetzt zu werden. Oberflächensedimente werden so als „Gedächtnis“ des partikulären Materials der Wasserphase genutzt und bei belasteten Probenahmestellen kontinuierlich ähnlich erhöhte östrogene Aktivitäten an (in Porenwässern, wässrigen Eluat und Extrakten). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Hefezellwand sich strukturell stark von pflanzlichen und tierischen Zellsystemen unterscheidet und damit auch eine veränderte Durchlässigkeit für EDC-aktive Substanzen besitzt. Eine Übersicht zu den ökotoxikologischen Bewertungsverfahren von Sedimenten befindet sich in Manz et al. (2007). Eine Literaturrecherche und die Abfrage zeigte, dass einige YES/YAS-Systeme ohne vorherige Probenaufkonzentration/Extraktion Rezeptorbindungen in Abwasser, Sedimenteluat, Porenwasser und sogar belastete Oberflächenwasser unterhalb von Kläranlagen nachzuweisen vermögen. Besonders vielversprechend aufgrund der geringen Variationskoeffizienten bei Mehrfachmessungen für Einzelsubstanzen und Umweltproben und der angegebenen Sensitivität für Einzelsubstanzen (LOEC von 0,49 ng/l 17-beta-Estradiol und 90 ng/l Testosteron) scheint das YES/YAS-System nach Sumpter (Routledge und Sumpter 1996), modifiziert mit einem Lyticase katalysierten Endverdau nach Schultis/Metzger (Schultis und Metzger 2004) zu sein (zum Vergleich siehe Tab. 1 und 2).

Ebenfalls wurden empfindliche YES-Varianten nach Sumpter (Nachweisgrenzen: 0,1-0,2 ng/l 17-beta-Estradiol) für Östrogenitätsstudien in der Schweiz verwendet (Vermeirssen et al. 2006). Der Fluss Lützelalmur wurde in der Nähe einer Kläranlage bei Aadorf untersucht. Oberhalb der Kläranlage wurden in 50 % der Fälle 17-beta-Estradioläquivalente (EEQ) nahe der Detektionslimits gemessen. Die Östrogenität im Auslauf der Kläranlage lag zwischen 0,2 und 7,7 ng/l EEQ, mit Mittelwerten die in den vier Probenahmeintervallen zwischen 1,5 und 3,9 ng/l EEQ schwankten. Unterhalb der Kläranlage (0,5 km) lagen die Messwerte bei über 95 % der Proben über der Nachweisgrenze und erreichten im Mittel $0,82 \pm 0,07$ ng/l EEQ. Dieses Ergebnis zeigt, dass einige besonders empfindliche YES-Varianten sensitiv genug sind, um Östrogenität im Auslauf der Kläranlage und 0,5 km flussabwärts anzuzeigen, für andere Anwendungen jedoch an Ihre Detektionsgrenzen geraten können. Ebenfalls wurde im NFP 50 die Östrogenität von Schweizer Flusssystemen und Abwässern mit dem YES-System nach Sumpter erfasst (Vermeirssen et al. 2008). Zusammenfassend konnten bei diesen Untersuchungen hohe Variabilitäten der östrogenen Aktivität gemessen werden, wobei diese vergleichbar zu anderen Ländern lag. Um integrativ östrogene Aktivitäten in Flusssystemen zu erfassen, wurden im NFP 50 Polar Organic Chemical Integrated Sampler (POCIS), als geeignete passive Probennehmer identifiziert (Vermeirssen et al. 2006; Vermeirssen et al. 2008).

Einfluss verschiedener Rezeptortypen Für viele östrogene und androgene rekombinante Verfahren (wie z.B. YES/YAS, ER/AR-Calux) werden überwiegend humane Rezeptoren eingesetzt (siehe Tab. 1 und 2), so dass eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf aquatische Organismen eingeschränkt wird, aber einen höheren Stellenwert für die menschliche Gesundheit einnehmen könnte. Die Verbreitung und die aktuelle Anwendbarkeit von auf Fischrezeptoren basierenden Testverfahren, einerseits in zellulären Rezeptorbindungsassays (Ackermann et al. 2002; Rutishauser et al. 2003), andererseits als Hefeassay (Kunz et al. 2006; Petit et al. 1995), konnte trotz Bemühungen nicht abgefragt werden. Allerdings entsteht derzeit für die OECD ein Review (OECD 2009, in prep.), für Testverfahren basierend auf Fischrezeptoren. Die YES/YAS und ER/AR-Calux-Systeme sind insgesamt besser als die Fischrezeptoren-Tests untersucht und verbreitet (siehe Tab.1 und 9), und zeigen so den aktuellen Stand der Technik und der Anwendbarkeit. Das Schutzziel sollte die Anwendungsentscheidung bestimmen. Allgemeiner Konsens besteht jedoch, dass es praktisch unmöglich ist, mit gängigen Testverfahren Qualitätskriterien festzulegen, die alle Organismen vor nachteiligen Effekten schützen (FNSNF 2008b). Das beinhaltet sowohl Tests mit Säuger- und Fischrezeptoren, als auch andere Testverfahren. Die vorgeschlagenen zellulären Rezeptorbindungsassays (YES/YAS und der ER/AR-Calux) vermögen aufgrund der geringen Versuchsdauer integrativ akute Veränderungen der Östrogenität und Androgenität in verschiedenen Umweltmatrices anzuzeigen. Der YES oder den ER-Calux werden auch im Schlussbericht der Eawag zur Ableitung von toxikologisch begründeten Qualitätskriterien für östrogenartig wirkende Stoffe (Escher und Vermeirssen 2008) als gut etablierte Verfahren für ein Umweltmonitoring empfohlen. Dennoch kann eine Proben-Extraktion zu einer Reduzierung der gemessenen Östrogenität von hormonaktiven Substanzen, wie z.B. 17-beta-Estradiol führen (Escher und Vermeirssen 2008). Durch Extraktionen kann sich die Probenmatrix und das Wirkgefüge der Inhaltsstoffe verändern, womit eine bioverfügbare Wirkung somit nicht erfasst, sondern lediglich Wirkungspotentiale abgebildet werden können. Eine emissionsbezogene Überwachung, z.B. für Abwasser mit einem validen, sensitiven und ausreichend robusten Testverfahren, wäre wünschenswert. Die Eignung der vorgeschlagenen YES/YAS- und ER/AR-Calux Testverfahren könnte im Rahmen von Normierungsverfahren auf unterschiedliche native und dotierte Umweltmatrixen geprüft werden.

5.1.4 Steroidgenese/Aromatasemodulation

Eine Störung des hormonellen Gleichgewichts kann auch durch Modulationen der Steroidgenese oder der Aromataseaktivität auftreten. Beide Mechanismen sind im Tierreich sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten verbreitet und bieten eine Angriffsfläche für endokrine Disruptoren. Im Rahmen des EDSP und eines OECD Validierungsprogramms wurde ein Screeningverfahren untersucht und validiert, welches Einfüsse auf die Steroidgenese an humanen Adenokarzinomzellen nachweisen kann. Dabei können Effekte entlang der gesamten Steroidsynthese-Kaskade

einschliesslich Metabolismus erfasst werden. Da die Steroidsynthese-Kaskade in den meisten Vertebraten identisch ist, können teilweise Effekte angezeigt werden, die direkt mit denen in Organismen vergleichbar sind. Der H295R Steroidgenesis Assay wurde bereits in Inter-Labor-Ringversuchen mit 6 Laboratorien aus 5 Nationen erfolgreich als robust, übertragbar und reproduzierbar validiert (Hecker et al. 2007a) und wird derzeit als OECD-Draft Testguideline eingereicht. Als Referenzsubstanzen werden Induktoren und Inhibitoren der Steroidgenese (Forskolin, Prochloraz) in einem 24-Well-Mikrotiterplattenformat verwendet und die Produktion von Testosteron und 17-beta-Estradiol wird mittels Enzyme-Linked-Immuno-Assay (ELISA), Radioimmunoassays oder LC-MS-Analyse durchgeführt. Zusätzlich kann eine Zellvitalität ermittelt werden. Nicht validiert, aber dennoch möglich, ist es das Verfahren in einer veränderten Variante parallel durchzuführen und Einflüsse auf die Aromataseaktivität nachzuweisen (Hecker et al. 2007b). 30 Verbindungen, von denen teilweise ein Einfluss auf die Steroidgenese bekannt ist, wurden mit diesem Verfahren erfolgreich getestet und es laufen weitere Experimente für aquatische Umweltprobestestungen. 2005 wurden bereits 24 marine Küstengewässerproben und Abwässer von 2 Abwasserkläranlagen mit dem H295R Steroidgenesis Assay untersucht (Gracia et al. 2008), doch mussten hohe Aufkonzentrierungen der Proben durch Extraktionen durchgeführt werden um überhaupt Effekte auf die Steroidgenese nachzuweisen. Hingegen konnten ohne hohe Aufkonzentrierungen bei der Untersuchung von Sedimentproben aus der Donau, sowohl stimulierende als auch inhibitorische Effekte auf die Synthese von 17-beta-Estradiol und Testosteron erfasst werden (Grund et al., in prep; Higley et al., in prep). Für den Wirkmechanismus der Steroidgenese gibt es *in vitro* keine Alternativerfahren. Für die Aromatasemodulation sind die Möglichkeiten ebenfalls sehr begrenzt und funktionieren entweder mit menschlichen placentalen Mikrosomen (Andersen et al. 2002) oder mit der menschlichen Tumorzelllinie KGN (Nishi et al. 2001). Sollte sich der H295R Steroidgenesis Assay in anderen Umweltprobestestungen, z.B. direkte Abwassertests, als ausreichend sensitiv erweisen, würde er die Möglichkeit bieten die Wirkmechanismen der Steroidgenesemodulation und bei ausreichender Validität auch der Aromatasemodulation mit einem Testverfahren als potentielle Angriffsflächen für endokrine Disruptoren abzudecken. Als valides und OECD genormtes Testverfahren wäre es trotz der Verwendung von Extrakten ein besonders interessantes Testverfahren für eine modulare Testpalette, da es als *In vitro*-Verfahren die vielfältigen Detektionsmöglichkeiten der rezeptorvermittelten Wirkungen sinnvoll ergänzen kann.

5.2 *In vivo*-Module

5.2.1 Problematik der Fischtests

Der in OECD-Validation befindliche Fish Screening Assay (FSA) beinhaltet mehrere Endpunkte, wie Vitellogenin-Induktion, sekundäre Geschlechtsmerkmale, Reproduktion (Eizahl) und optional Gonadenhistologie (OECD Environment Directorate, No. 94 (2008)). *Danio rerio* reagiert mit mehreren dieser Endpunkte auf umweltrelevante 17-beta-Estradiol Konzentrationen (unteren ng/l Bereich) (Segner et al. 2003) und kann Effekte differenziert aufzeigen. Thyroidale Effekte vermag der FSA jedoch nicht anzuzeigen und es handelt sich um einen aufwändigen und bewilligungspflichtigen Vertebratentest. Die unterschiedlichen, teilweise artspezifische Empfindlichkeiten (*Danio rerio*, *Pimephales promelas*, oder *Oryzias latipes*) für bestimmte Wirkmechanismen und Endpunkte werfen zusätzliche Fragen auf, die nur bei ausreichender Kenntnis des Testverfahrens zu beantworten sind. Die diversen Endpunkte im FSA könnten sich aus regulatorischer Sicht als problematisch erweisen, da geklärt werden muss welche dieser Parameter in eine gesetzliche Umweltrisikobewertung einbezogen werden sollte (Knacker et al. 2007). Der Biomarker Vitellogenin beispielsweise kann als wertvoller mechanistischer Warnhinweisgeber verstanden werden, um Entscheidungen für chronische Testungen zu treffen (Hutchinson et al. 2006). Man sollte ihn jedoch nicht isoliert für Risikobewertungen heranziehen. Zum jetzigen Zeitpunkt existiert auf regulatorischer Ebene kein national oder international kein hinreichend etabliertes Verfahren, das zwingend zum Nachweis eines begründeten Verdachtes auf endokrine Wirksamkeit einer Substanz bei Fischen angewendet werden muss (Schäfers et al. 2008) und auch keine dafür akzeptierte Prüfstrategie. Das deutsche Umweltbundesamt hält jedoch die verfügbare Datenlage zum FSA für ER-Agonisten und Aromatasehemmer für

ausreichend, um falsch negative Ergebnisse mit der erforderlichen Sicherheit auszuschließen (Schäfers et al. 2008). Ebenfalls ist anzunehmen, dass die gewählten *In vitro*-Module bereits einen Teil der vertebratenrelevanten östrogene und androgene Effekte erkennen können, daher ist der FSA nicht in der modularen Testpalette vertreten. Trotz der Sensitivität des FSA in mehreren Endpunkten, können wir ihn aufgrund der internationalen Bestrebungen Vertebratentest zu minimieren und dem grossen Arbeitsaufwand nicht für ein Umweltmonitoring empfehlen.

Möchte man Vitellogenin bei *in situ* Untersuchungen an heimischen freilebenden Arten für eine Expositionsabschätzung nutzen, so sollten bestimmte Faktoren berücksichtigt werden; verändert nach (Segner 2009):

- Die Vitellogenin Antwort kann neben den EDC-Wirkungen auch durch andere physiologische Zustände der Versuchstiere (Saisonalitäten, Umweltfaktoren) beeinflusst werden
- Der zeitliche Verlauf der Biomarker-Antwort sollte bekannt sein (z.B. Dauer der Induktion und Adaptation)
- Um Migrationseffekte und Variabilitäten zu minimieren, sind die Versuchstiere standortstreu zu halten
- Eine Kombination der Biomarker-Messungen mit *In vitro*-Verfahren und einer chemischen Analytik ist vorzuziehen

5.2.2 Thyroidale Modulation

Obwohl viel Forschung an Amphibien über endokrine Disruption, hauptsächlich durch östrogene Substanzen an Effekten auf die Reproduktion durchgeführt wurde, so wird ein Einfluss auf das Thyroid-System, welches den Metamorphoseablauf steuert, als stärkerer Faktor in deren Populationsökologie eingeschätzt als eine mittlere Verschiebung des Geschlechterverhältnisses (Kloas 2002). Amphibien werden als beste Modelle unter den Vertebraten eingeschätzt um eine endokrine Disruption des Thyroidsystems mit einfach messbaren Endpunkten zu bewerten. Da die Einflüsse auf das Thyroid-System sehr unterschiedlich und komplex sein können werden *In vivo*-Tests als geeignetere Testansätze verstanden um thyroideale Modulationen über eine beschleunigte oder verlangsamte Metamorphose anzuzeigen. Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird als Modellorganismus für Amphibien verwendet und reagiert z.B. erst bei relativ hohen Konzentrationen an Östrogenen und Androgenen mit einer Verschiebung seines Geschlechterverhältnisses (10^{-8} mol/l E2; 10^{-8} mol/l EE2, 10^{-8} mol/l DHT) (Kloas 2002). Ebenfalls wird das Überleben der Embryonen auch bei relativ hohen Konzentrationen (10^{-5} mol/l E2, $>10^{-5}$ mol/l EE2, 10^{-5} mol/l Diethylstilbistrol) an östrogenen und auch androgenen Substanzen, wie Dihydrotestosteron (DHT) beeinflusst (Nishimura et al. 1997). Hingegen vermag der Assay Beeinflussungen des Thyroidstoffwechsels sensitiv über einen veränderten Metamorphoseablauf anzuzeigen (Kloas 2002). Der Amphibien Metamorphose Assay mit *Xenopus laevis*, auch XEMA, steht kurz vor der offiziellen Verabschiedung als OECD-Richtlinie (siehe Tab. 5 + 6). Da das Testverfahren erst bei relativ hohen Konzentrationen auf östrogene und androgene Steroidhormone anspricht, stellt es eine gute Ergänzung zu den östrogenen und androgenen Wirkmechanismen in der modularen Testpalette dar, da Überlagerungseffekte vermieden werden können. Die Versuchsdauer des XEMA beträgt 3 Wochen, doch sind Vortestungen und Auswertungen relativ arbeits- und zeitaufwendig. Eine vielfältige Anwendbarkeit für Umweltmatrices wurde angegeben (siehe Abb. 13). Neben morphologischen Parametern für den Metamorphoseablauf besteht die Möglichkeit den XEMA um eine Schilddrüsenhistologie oder Genexpressionsanalysen (z.B. auch Vitellogenininduktion (Kloas et al. 1999) zu erweitern. Es ist derzeit nicht möglich den Stellenwert einer thyroidalen Modulation im Bezug auf andere Mechanismen der Endokrinen Disruption anzugeben. Um diesen Wirkmechanismus erfassen zu können, wäre ein Nachweis in einer modularen Testpalette möglich, obwohl zu bedenken ist das Vertebratentests generell minimiert werden sollen.

Neuere Entwicklungen von Testverfahren an Echinodermaten (Heart-Urchin-ELS) zeigen, dass es ebenfalls möglich ist, thyroideale Modulationen schon in Invertebratensystemen nachzuweisen. Der Heart-Urchin-ELS betrachtet die Embryonalentwicklung der Versuchstiere in 24 Well-Mikrotiterplatten über eine Versuchsdauer von 10 Tagen. Die technischen Möglichkeiten zur Verfolgung der Embryonalentwicklung und deren Auswertung werden derzeit untersucht (Murk 2009). Ebenfalls zu erwähnen ist, dass es auf zellulärer Ebene kommerzielle Calux-Rezeptorbindungsassays für die

Thyroidrezeptoren alpha und beta gibt. Da die thyroideale Antwort jedoch komplex ist können somit wahrscheinlich nur Wirkpotentiale abgebildet werden, was einen Einsatz für Screening Anwendungen ermöglicht.

5.2.3 Embryo- und Entwicklungstoxizität

Sollten in Umweltproben starke unspezifische toxische Effekte zu erwarten sein, die eine Anwendung der anderen *In vivo*-Module verhindert, so wäre ein valides Testverfahren notwendig, welches diese Toxizität frühzeitig anzeigt. Hierbei kann der umfassend OECD, DIN und ISO (ISO FDIS 15088 2007 und siehe Tab. 5 und 6) normierte Fischeitest als schnell durchzuführender *In vivo*-Test eingesetzt werden ohne adulte Fische einsetzen zu müssen. Er erlaubt embryotoxische Effekte nachzuweisen, die ebenfalls fortpflanzungsrelevant sein können und wird in der deutschen Abwasserverordnung nach DIN 38415-T6 eingesetzt.

Es werden Fischeier des Zebraäbrblings *Danio rerio* eingesetzt und deren Überleben nach 48 h bestimmt. Die Verdünnungsstufe der Probe, bei der mehr als 90% der Fischeier überleben wird als nichteffektive Verdünnungsstufe angegeben. Als Referenzsubstanz für den Test dient 3,4-Dichloranilin. Mit 48 h wird nur ein relativ kurzes Expositionsfenster erfasst, was dazu führen könnte, dass später auftretende toxische Effekte wie z.B. Deformationen bei der Entwicklung nicht erfasst werden. Hierzu wäre die Einbeziehung von weiteren, sensitiveren, entwicklungsrelevanten Parametern, ohne den Test zu verlängern zu empfehlen. Hohe Konzentrationen an EDCs und deren Metabolite, wie z.B. Nonylphenol können im akuten Fischeitest subletale und letale Effekte verursachen (Kammann et al. 2009).

Theoretisch könnten der Fish Early Life Stage Test (ELST) nach OECD 210 oder der Fish Juvenile Growth Test nach OECD 215 alternativ angewendet werden, um Einflüsse auf die (Embryonal- und Larvalentwicklung von Fischen nachzuweisen, doch würde sich bei beiden Verfahren der Zeit- und Arbeitsaufwand deutlich steigern (siehe Tab. 5 + 6). Um zukünftig ethisch umstrittene, bewilligungspflichtige Vertebraten-Tests zu minimieren und gleichzeitig heimische aquatische Schlüsselarten zu verwenden, sollte nach möglichen alternativen Invertebratentests zum Nachweis von endokriner- und fortpflanzungsrelevanter Wirkungen Ausschau gehalten werden und deren Entwicklung gefördert werden. Die OECD (OECD 2006) hat ein detailliertes Reviewpaper veröffentlicht, das sich mit der Eignung von Invertebraten zum Nachweis von Entwicklungs-, Reproduktions- und endokrinen Effekten befasst. Da immer mehr vertebratenähnliche Steroidhormone in einigen Invertebraten gefunden werden, wurden nicht akute (subchronische oder chronische) Invertebratentests als Alternativen angegeben, auch wenn diese kein Ersatz für einen Vertebratentest sind. Ein Vertreter der Crustaceen, wie z.B. der Amphipode *Gammarus pulex*, könnte zu einem vielversprechenden Modell-Organismus werden, insbesondere auch wegen ihrer ökologischen Relevanz in europäischen Gewässern (OECD 2006). Erste Resultate aus Feld- und Laborstudien mit Gammariden weisen darauf hin, dass Endpunkte wie die Induktion des Heat Shock Proteins 90 und Vitellogenin, sowie auch das Geschlechter-Verhältnis und die Gonaden-Histologie, als Anzeiger für endokrine Effekte genutzt werden könnten (Kunz et al. 2009b; Watts et al. 2002; Gross et al. 2001).

5.2.4 Reproduktions- und Invertebratentest

Invertebraten stellen einen Großteil der bekannten Arten. Die Gruppe der Mollusken beträgt mehr als 130000 rezente Arten, wovon ungefähr 85% zu den Gastropoden zählen (Oehlmann et al. 2007). Auch wenn die genauen Mechanismen der endokrinen Disruption in Gastropoden noch diskutiert werden (Oehlmann et al. 2007), so stellt wahrscheinlich die Aromatasehemmung eine wichtige Angriffsfläche dar. Bei Mollusken, die über generell schwächere Metabolisierungsreaktionen verfügen als Vertebraten, können auch stärkere Bioakkumulationseffekte auftreten. Mit *Potamopyrgus antipodarum* konnte bereits ein Effektmonitoring an Sedimenten durchgeführt werden (Schulte-Oehlmann et al. 2001). Der Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* befindet sich in einer frühen Prävalidierungsphase der OECD. Eine Zählung der Embryonen in der Bruttasche der Schnecken dient als einfacher bestimmender Endpunkt und bietet die Möglichkeit stimulierende und hemmende reproduktionsrelevante Effekte nachzuweisen. Jedoch kann es zu Überlagerungen mit allgemeintoxischen Effekten oder saisonalen Rhythmen kommen (Duft et al. 2007). Entgegen der

verbreiteten Meinung, reagieren Schnecken (*Potamopyrgus antipodarum*, *Marisa cornuarietis*, *Nassarius reticulatus*) nicht nur auf Organozinnverbindungen, sondern auch vielfältig auf nachgewiesene östrogene und androgene aktuelle Belastungspotentiale in umweltrelevanten Konzentrationen (Duft et al. 2007). So belegen neuere Studien dass *Potamopyrgus antipodarum* auch in der Lage ist, das östrogene Potential von UV-Filtern über Erhöhungen der Embryonenzahl anzuzeigen (Schmitt et al. 2008). Eine östrogene Aktivität von UV-Filtern konnte auch im Rahmen des NFP 50 *in vitro* und *in vivo* an Fischen nachgewiesen werden (Kunz et al. 2006). Es handelt sich also um ein Invertebratensystem, welches eine hohe Empfindlichkeit für vertebratenrelevante geschlechtshormonaktive Substanzen (z.B. Methyltestosteron, Fenamirol, Bisphenol A, Octylphenol, Ethinylestradiol) besitzt, damit ergänzt es sich gut mit dem XEMA, der vorwiegend thyroideale Modulationen anzeigt.

Ebenfalls in der OECD-Validierung befinden sich zwei Copepoden-Life-Cycle-Tests (siehe Tab. 5 und 6 und Kusk und Wollenberger (2007)). Copepoden (Ruderfußkrebse) bilden mit ca. 14000 Arten die artenreichste Gruppe der Crustaceen. Aufgrund der geringen Größe und der geringen Generationszeit (17–18 Tage von Ei zu Ei) kann *Amphiascus tenuiremis* im 96 Well Mikrotiterplattenformat für Untersuchungen eingesetzt werden. Sofern beide Tests die erforderlichen Eigenschaften für ein Umweltmonitoring besitzen, könnten diese eventuell für marine Umweltproben mit mittlerer und hoher Salinität eingesetzt werden.

Der OECD genormte Daphnien-Reproduktionstest (der derzeit um endokrine Endpunkte erweitert wird) und der Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* sind im Vergleich zu dem bereits OECD genormten und in der Erweiterung befindlichen Chironomidentest variabel für Sediment-, Abwasser und Oberflächenwasser anwendbar (siehe Abb. 13). Weitere Vorteile des Daphnien-Reproduktionstests liegen in seiner weiten Verbreitung, da dieser bereits für die europäische Pflanzenschutzmittelrichtlinie zum Einsatz kommt. Ausserdem ist der Daphnien-Reproduktionstest mit einer 3-wöchigen Versuchszeit schneller als der Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* (4–8 Wochen). Derzeitig wird eine Erweiterung für den Endpunkt Geschlechterverhältnis der Nachkommen validiert (OECD 93 2008). In einem Interlaborvergleich wurden als Referenzsubstanzen 3,5-Dichlorophenol und Pyriproxifen eingesetzt, wovon nur in 5 von 10 Laboratorien die Validitätskriterien für Pyriproxifen und in 7 von 8 Laboratorien die Validitätskriterien für 3,5-Dichlorophenol erreicht wurden. Insgesamt kann aufgrund der vorhandenen Information noch nicht ausgesagt werden ob die Erweiterung um das Geschlechterverhältnis der Nachkommen sich als empfindlicher erweisen wird (OECD 93 2008). Allerdings liegt der angegebene Arbeitsaufwand für den *Daphnia magna* Reproduktionstest auch ohne Erweiterung schon höher als der Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* (siehe Abb. 8). Im Gegensatz zum Daphnien-Reproduktionstest reagieren Schnecken auf vielfältige östrogene und androgene Substanzen sensitiv, die auch in Vertebraten ein endokrines Potential besitzen (Duft et al. 2007) (und siehe Abb. 12). Es ist abhängig von der Wahl des Schutzzieles welches Testverfahren bevorzugt werden sollte. Da es sich bei *Potamopyrgus antipodarum* (neuseeländische Zwergdeckelschnecke) um einen nichtheimischen Vertreter der Schnecken handelt, sollten Laborexperimente gegenüber Feldexperimenten bevorzugt werden um mögliche Faunenverfälschungen zu vermeiden. Bei der langen Versuchszeit und den Überlagerungsmöglichkeiten mit dem Reproduktionszyklus (Frühjahr und Herbst) könnten wahrscheinlich auch nur wenige Proben im Jahr untersucht werden. Aufgrund des Artenreichtums, der breiten Sensitivität und der nachgewiesenen vielseitigen Anwendbarkeit für ein Umweltmonitoring wären Schneckentests aus ökotoxikologischer Sicht zu empfehlen, sofern sich diese Verfahren auch als ausreichend valide und übertragbar erweisen.

5.3 Funktionsprinzip der modularen Testpalette

Durch Schadstoffe in Umweltproben können vielfältig gerichtete Wirkungen auftreten, die einander überlagern und berücksichtigt werden müssen. Die modulare Testpalette versucht dabei, die unterschiedlichen Wirkmechanismen der endokrinen Disruption und reproduktionstoxische, bzw. embryotoxische Effekte in verschiedenen *In vitro*- und *In vivo*-Modulen gemeinsam zu erfassen. Durch die kombinierte Anwendung der Module (siehe Abb. 16) sollte es möglich sein von den elementaren biochemischen Wirkmechanismen bis zu organismischen Effekten auch populationsrelevante Wirkpotentiale nachzuweisen.

Auf der *In vitro*-Seite können einige empfindliche YES/YAS-Systeme und die verschiedenen Calux-Systeme als zelluläre Verfahren eine agonistische und antagonistische Rezeptorbindung an verschiedenen Hormonrezeptoren erfassen. Ebenfalls kann der H295R-Steroidgenese-Assay Modulationen der Steroidgenese und eventuell auch der Aromataseaktivität nachweisen und ergänzt damit gut die vielfältigen Detektionsmöglichkeiten für rezeptorvermittelte Wirkungen.

Auf der *In vivo*-Seite kann eine populationsrelevante Reproduktionstoxizität sowohl durch hormonaktive Wirkungen als auch durch allgemeintoxische Wirkungen verursacht werden. Daher wurden die Reproduktionstests mit *Potamopyrgus antipodarum* und *Daphnia magna* empfohlen, da diese derzeit verfügbar sind.

Sollten zu starke toxische Effekte eine Anwendung der empfohlenen Module behindern (hier muss dann in der Regel in Verdünnungen getestet werden, die unterhalb der (Zyto)toxizität liegen), so kann *in vitro* ein biochemischer Rezeptorbindungassay integrativ agonistische und antagonistische Rezeptorbindungen erfassen. Starke toxische, bzw. embryotoxische Wirkungen können, z.B. relativ schnell durch den Fischeitest identifiziert werden oder man benutzt einen nicht akuten Invertebratentest, der auch verzögerte und langzeit Effekte anzeigen kann. Da der Stellenwert der thyroidalen Modulation an einer endokrinen Disruption nicht zu bestimmen ist könnte man optional den XEMA zum Nachweis thyroidalen Effekte benutzen oder Calux-Verfahren als Screeningtests. Durch die internationalen Bestrebungen Vertebratentests zu minimieren ist die Entwicklung sensitiver Invertebratentests zu fördern und anzuregen.

In vitro-Tests können eingesetzt werden um akute Qualitätsziele zu überprüfen, hingegen die *In vivo*-Tests dazu dienen können auch chronische Qualitätsziele zu überprüfen, beispielsweise wenn an bestimmten Einleitungstellen hohe Belastungen organischer Mikroverunreinigungen gefunden werden.

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dem Forschungsbericht zur Gewässerrelevanz endokriner Stoffe und Arzneimittel (Moltmann et al. 2007) konnte anhand aquatisch relevanter Schadstoffe mit *In vivo*-Tests gezeigt werden, dass endokrine Endpunkte (bei 31 von 71 untersuchten Stoffen) empfindlicher sein können als allgemeine ökotoxikologische Endpunkte (z.B. Mortalität, Wachstum usw.). Eine Einschätzung für welche Substanzen und in welchem Ausmaß dies in der Umwelt zutrifft, ist bei der Vielfalt der Umweltchemikalien und derer gegenseitigen Beeinflussungsmöglichkeiten nicht möglich. Daher sollten hormonaktive und allgemeintoxische Effekte integrativ durch ökotoxikologische Biotestpaletten erfasst und differenziert werden.

Bei der Vielfältigkeit der endokrinen Wirkmechanismen bedarf es einer modularen Kombination von *In vivo*- und *In vitro*-Verfahren in einer modularen Testpalette, um auch die fließenden Übergänge von hormonaktiven Wirkungen bis zu einer endokrinen Disruption und reproduktionstoxischen Effekten erfassen und differenzieren zu können. Geforderte Kriterien wie Nachvollziehbarkeit, Relevanz, Reproduzierbarkeit und Plausibilität, müssen bei einem geeigneten ökotoxikologischen Verfahren nicht ausgeschlossen werden, doch bedarf es valider und übertragbarer Methoden für eine Bewertung. Daher war neben einer Umweltprobentauglichkeit die Validierung und die Verbreitung der Testverfahren, zumindest aber eine gute Möglichkeit zur Standardisierbarkeit, ein wichtiges Kriterium bei deren Auswahl.

Der Fischeitest ist mehrfach genormt, XEMA und H295R Steroidgenese Assay sind sehr weit im OECD-Validierungsprozess fortgeschritten. Der Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* hat sich bereits für ein Umweltmonitoring bewährt (Schulte-Oehlmann et al. 2001) und wird wahrscheinlich von der OECD validiert werden. Für verschiedene YES/YAS-Systeme bestehen jahrelange Erfahrungswerte für Umweltprobenbewertungen, die ER/AR-Calux-Systeme sind ebenfalls in einer frühen Validierungsphase der OECD, auch bei den molekularen Rezeptorbindungassays laufen derzeit mehrere Validierungen der OECD (siehe Tab. 5 + 6). Das vorgestellte modulare System erlaubt einen Austausch der Testmodule nach dem sich kontinuierlich entwickelnden Stand der Technik, ohne Neuentwicklungen oder Gegebenheiten zu einer veränderten Gesetzeslage (z.B. Vermeidung von Vertebratentests) auszuschließen.

Die Testpalette ermöglicht eine umfassende wirkungsbezogene Risikobewertung für die aquatische Umwelt, wobei der Testumfang auf die Ansprüche der Anwender angepasst werden kann. Es können fortpflanzungsrelevante Wirkungen an Invertebraten, Amphibien und Fischen, ebenso wie wirkmechanistische Ansätze der östrogenen und androgenen Rezeptorbindung, der Steroidgenese, eventuell sogar der Aromatase modulation erfasst werden. Es stellt einen möglichen

wirkungsbezogenen Lösungsweg für eine Risikobewertung der endokrinen Disruption und hormonaktiven Substanzen in der Umwelt dar. Sollte ein Teil aus dieser Testpalette für Umwelthanwendungen genormt und anschließend flächendeckend für ein Umweltmonitoring eingesetzt werden, so wäre eine Grundlage gegeben eine Risikobeurteilung und ein Risikomanagement für die endokrine Disruption einzuleiten.

Danksagung Ein besonderer Dank gilt den Anwendern und Entwicklern die sich bereit erklärt haben im Rahmen der Kriterienabfrage Daten zu den Testverfahren bereitzustellen und zu belegen. Ebenfalls möchte ich den hilfsbereiten Ansprechpartnern der Umweltämter Herrn Dr. Pluta und Herrn Dr. Stolzenberg (UBA) sowie Herrn Dr. Schärer und Herrn Dr. Studer (BAFU) für Ihre Unterstützung danken.

Literatur

- 2000/60/EG (WRRL): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. Amtsblatt Nr. L327 vom 22.12.2000: 1-73
- Ackermann G E, Brombacher E, Fent K (2002): Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:1864-1875
- Ackermann G, Schwaiger J, Negele R D, Fent K (2002): Effect of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology* 60:203-22
- Andersen H R, Andersson A M, Arnold S F, Autrup, Barfoed M, Beresford N A, Bjerregaard P, Christiansen L B, Gissel B, Hummel R, Jorgensen E B, Koorsgaard B, Le Guevel R, Leffers H, McLachlan J, Moller A, Nielsen J B, Olea N, Oles-Karasko, Pakdel F, Pedersen K L, Perez P, Skakkeboek N E, Sonnenschein C, Soto A M, Sumpter J P, Thorpe S M, Grandjean P (1999): Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 107:89-108
- Andersen H R, Wollenberger L, Halling-Sorensen B, Kusk K O (2001): Development of copepod nauplii to copepodites – a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:2821-2829
- Andersen H R, Vinggaard, Rasmussen T H, Gjermansen I M, Bonefeld-Jorgensen E C (2002): Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179:1-12
- Ankley G, Mihaich E, Stahl R, Tillitt D, Colborn T, McMaster S, Miller R, Bantle J, Campbell P, Denslow N, Dickerson R, Folmar L, Fry M, Giesy J, Gray E, Guiney P, Hutchinson T, Kennedy, S, Kramer V, LeBlanc G, Mayes M, Nimrod A, Patino R, Peterson R, Purdy R, Ringer R, Thomas P, Touart L, van der Kraak G, Zacharewski T (1997): Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17, No. 1:68-87, SETAC, USA
- Ankley G T, Jensen K M, Kahl M D, Korte J J, Makynen E A (2001): Description and Evaluation of a short-term reproduction test with the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1276-1290
- Ankley G T, Jensen K M, Kahl M D, Korte J J, Makynen E A (2001). DESCRIPTION AND EVALUATION OF A SHORT-TERM REPRODUCTION TEST WITH THE FATHEAD MINNOW (PIMEPHALES PROMELAS). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20:1276-1290
- Baatrup E, Junge M (2001): Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*). *Environmental Health Perspectives* 109: 1063-1070
- Belt K v d, Berckmans P, Vangenechten C., Verheyen R., Witters H. (2004): Comparative study on the *in vitro/in vivo* estrogenic potencies of 17- β -estradiol, estrone, 17- α -ethinylestradiol, and nonylphenol. *Aquatic Toxicology* 66:183-195
- Ballegooy C (2008): Endokrine Wirkungen (anti)androgener Substanzen bei der Ploetze (*Rutilus rutilus*). Dissertation der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, BRD
- Barata C, Porte C, Baird D (2004): Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates a review. *Ecotoxicology* 13:511-517
- Bätscher R, Studer C, Fent K (1999): Stoffe mit endokriner Wirkung in der Umwelt. Schriftenreihe Umwelt Nr. 308. Herausgegeben von der Eidg. Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) und dem Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL)
- BKH (2000): European Commission DG ENV. Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption- preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. Final Report. BKH Consulting Engineers, Delft, The Netherlands in association with TNO Nutrition and Food Research, Zeist, The Netherlands. Project: M0355008/1786Q/10/11/00
- Braunbeck T (1993): Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen und Mollusken zum Nachweis letaler und subletaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. *PAÖ* 7: 537-559
- Charles G D (2004): *In vitro* models in endocrine disruptor screening. *ILAR Journal* 45(4):494-501
- Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, Kah O, Eggen R I (2008): Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 155(1):31-62
- Coe T S, Hamilton P B, Hodgson D, Paull G C, Stevens J R, Sumner K, Tyler C R (2008): An environmental estrogen alters reproductive hierarchies, disrupting sexual selection in group-spawning fish. *Environ Sci Technol*, 42:5020-5025
- COM (99)706 (1999): Community Strategy for Endocrine Disruptors COM (99)706; COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL AND THE EUROPEAN PARLIAMENT (1999), <http://ec.europa.eu/environment/docum/99706sm.htm>

- COM(2006) 397 final: Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on environmental standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. Commission of the European Communities, Brussels, 17.07.2006. COM(2006) 397 final. 2006/0129 (COD)
- Commission of the European Communities (1996): Technical guidance document in support of directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation 1488/94, risk assessment for existing substances. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, Belgium
- Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, van der Kraak G (2003): Global Assessment of the state of the science of endocrine disruptors. World Health Organisation /PCS/EDC/02.2
- Depledge M H und Fossi M C (1998): The role of biomarkers in environmental assessment: 2. invertebrates. *Ecotoxicology* 3, 112-129.
- Desbrow C, Routledge E J, Brighty G C, Sumpter J P Waldcock M (1998): Identification of estrogenic chemicals in STW effluent 1. Chemical Fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* 11:1549-1558
- Duft M, Schmitt C, Bachmann J, Brandelic C, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J (2007): Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals—an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology* 2007;16:169-182. DOI 10.1007/s10646-006-0106-0
- Dutta P, Hill K, Datskos P G, Sepaniak M J (2007): Development of a nanomechanical biosensor for analysis of endocrine disrupting chemicals. *Lab Chip* 7:1184-1191. The Royal Society of Chemistry
- Eawag (2008): Zebrafisch-Sensoren in der Ökotoxikologie. *Eawag News* 64d, Eawag das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereichs
- EC (European Commission) (1997): (DG XII – Environment and Climate Research Programme). European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on human Health and Wildlife. Report of Proceedings of a Workshop 2-4 December 1996, Weybridge, UK. Commission of the European Community, Brussels; Report EUR 17549.
- Eggen R (2008): Rolle der Östrogene in der Organogenese In: Zebrafisch-Sensoren in der Ökotoxikologie. *Eawag News* 64d, Eawag das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereichs
- Eggs, Brian R. (2002): Chemical Sensors and Biosensors. Analytical Techniques in the Sciences. 2. Edition, Wiley.
- Escher B, Vermeirssen E (2008): Mikroverunreinigungen in schweizerischen Fließgewässern: Konzepte zur Beurteilung von Mischungen in der Ableitung von toxikologisch begründeten Qualitätskriterien für östrogenartig wirkende Stoffe. Eawag Schlussbereich zuhanden des BAFU, 30. Oktober 2008
- Fechner P, Pröll F, Carlquist M, Proll G (2008): An advanced biosensor for the prediction of estrogenic effects of endocrine-disrupting chemicals on the estrogen receptor alpha. *Anal Bioanal Chem*. DOI 10.1007/s00216-008-2480-3
- Fent K (1995): Endokrin wirksame Stoffe in der Umwelt: Erkenntnisstand und Probleme. In: Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. UBA-Texte 65/95 ISSN 0722-186X
- Fent K (2000): Hormonaktive Stoffe in Gewässern: Auch eine Gefahr fürs Trinkwasser? Gesellschaft für Lebensmittelhygiene, Mitt. Lebensm. Hyg. 9:11-25
- Fine T, Leskinen P, Isobe T, Shiraishi H, Morita M, Marks RS, Virta M (2006): Luminescent yeast cells entrapped in hydrogels for estrogenic endocrine disrupting chemical biodetection. *Biosensors and Bioelectronics* 21:2263-2269
- Folmar L C, Hemmer M J, Denslow N D, Kroll K, Chen J Cheek, Richman H, Meredith H., Grau G. E.(2002): A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethinylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo und in vitro. *Aquatic Toxicology* 60:101-110
- FNSNF (2008a): Nationales Forschungsprogramm „Hormonaktive Stoffe“. Öffentlicher Schlussbericht. Schweizerischer Nationalfonds
- FNSNF (2008b): Konsensplattform “Hormonaktive Stoffe in Abwässern und Gewässern” Schlussdokument. Nationales Forschungsprogramm “Hormonaktive Stoffe“. <http://www.nrp50.ch/final-products/final-reports-consensus-plattforms.html>
- Fröhlicher M (2008): Zebrafisch ohne Oestrogenrezeptoren. In: Zebrafisch-Sensoren in der Ökotoxikologie. *Eawag News* 64d, Eawag das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereichs
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J (2005): Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus* sp. collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environmental Research* 98:89-99
- Garcia-Reyero N, Grau E, Castillo M, Lopez de Alda M J, Barcelo D, Pina B (2001): Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1152-1158
- Gerhardt A (1999): Biomonitoring of polluted waters. *Trans tec Publ*, 301 pp.
- Gerhardt A (2007): Behavioural ecotoxicology- prospects and limitations. *HERA* 13 (3):481-492.
- Global Water Research Coalition (2006): In Vitro Bioassays To Detect Estrogenic Activity in Environmental Waters. Literature Review
- Gracia T, Jones P D, Higley E B, Hilscherova K, Newsted J L, Murphy M B, Chan A K Y, Zhang X, Hecker M, Lam P K S, Wu R S S, Giesy J P (2008): Modulation of steroidogenesis by coastal waters and sewage effluents of Hong Kong, China using the H295R assay. *Environ Sci Pollut Res*, DOI 10.1007/s11356-008-0011-6
- Gross M Y, Maycock D S, Thorndyke M C, Morrit D, Crane M (2001): Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1792-1797.
- Gutendorf B., Westendorf J. (2001): Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166-79-89
- Gülden M, Turan A und H Seibert (1997) Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. UBA- Texte 46/97, Umweltbundesamt Berlin
- Gray L E, Ostby J, Wilson V, Lambright C, Bobseine K, Hartig P, Hotchkiss A, Wolf C, Furr J, Price M, Parks L, Cooper R L, Stoker T E, Laws S C, Degitz S J, Jensen K M, Kahl M D, Korte J J, Makynen E A, Tietge J E, Ankley G T (2002): Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing Filling key data gaps. *Toxicology* 181-182:371-382
- Hansen P-D, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M, Blaise C (1998): Vitellogenin a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal Chem* 17:4, 48– 45

- Hansen P-D (2000): Erfassung und Bewertung "unerwünschter Wirkungen" mit Biotests und Biosensoren. In: Schriftenreihe Wasserforschung, No.6: Chemische Stressfaktoren in aquatischen aquatischen Systemen, Herausgeber: Wasserforschung e.V. interdisziplinärer Forschungsverband
- Harries J E, Runnalls T, Hill E, Harris C A, Maddix S, Sumpter J P, und Tyler C R (2000). Development of a Reproductive Performance Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using Pair-Breeding Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Sci. Technol. 34:3003–3011
- Hartig P C, Cardon M C, Blystone CR, Gray L E Jr, Wilson V S (2008): High throughput adjustable 96-well plate assay for androgen receptor binding: a practical approach for EDC screening using the chimpanzee AR. Toxicology Letters 181:126-131
- Hecker M, Hollert H, Cooper R, Vinggaard A-M, Akahori Y, Murphy M, Nellemann C, Higley E, Newsted, Wu R, Lam P, Laskey J, Buckalew A, Grund S, Nakai M, Timm G, Giesy J (2007a). The OECD Validation Program of the H295R Steroidogenesis Assay for the Identification of In vitro Inhibitors or Inducers of Testosterone and Estradiol Production. Phase 2: Inter Laboratory Pre- Validation Studies. Env Sci Pollut Res 14, Special Issue, 23-30
- Hecker M, Timm G, Vinggaard A-M, Nelleman C, Akahori Y, Cooper R, Hollert H, Han S-Y, Murphy M B, Newsted J L, Giesy J P (2007b): Validation of a H295R Cell Line Screening Test to Evaluate toxicant-Induced Effects on Steroidogenesis. Vortrag bei der koreanischen Food an Drug Administration im Oktober 2007
- Hock B, Seifert M (1998): Monitoring-Strategien für östrogene Wirkstoffe. Bioforum 11:690-696.
- Hollert H, Dürr M, Holtey-Weber R, Islinger M, Brack W, Färber H, Erdinger L, Braunbeck T (2005): Endocrine Disruption of Water and Sediment Extracts in a Non-Radioactive Dot Blot/RNase Protection-Assay Using Isolated Hepatocytes of Rainbow Trout. Environ Sci Pollut Res 12 (6) 347-360
- Hutchinson T H, Ankley G T, Segner H, Tyler C R (2006): Screening an Testing for Endocrine Disruption in Fish-Biomarkers As „Signposts“, Not "Traffic Lights" in Risk Assessment. Environmental Health Perspectives 114:106-114
- ISO/FDIS 15088 (2007): Water quality-Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)
- Jobling S, Sumpter J P (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Aquatic Toxicology 27:361-372
- Kammann U, Vobach M, Wosniok W, Schäffer A, Telscher A (2009): Acute toxicity of 353-nonylphenol and its metabolites for zebrafish embryos. Environ Sci Pollut Res 16:227-231. DOI 10.1007/s11356-008-0097-x.
- Kang I J, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H, Honjo T (2002): Effect of 17-beta-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*).Chemosphere 47:71-80
- Kase R. (2004): Salinitätseinflüsse auf suborganismische Testsysteme zur Erfassung von ökotoxikologischen Sedimentwirkungen. Diplomarbeit, angefertigt an der TU Berlin am Institut für Ökologie im Fachgebiet Ökotoxikologie
- Kase R, Hansen P-D, Fischer B, Heininger P, Manz W, Reifferscheid G (2007): Integral Assessment of Estrogenic Potentials of Sediment-Associated-Samples. Part I: The Influence of salinity on the in vitro tests ELRA, E-screen and YES. Env Sci Pollut Res. , 15 ESPR (1) 75-83 (2008) <http://dx.doi.org/10.1065/espr2007.06.429>
- Kase R, Hansen P-D, Fischer B , Heininger P, Manz W, Reifferscheid G (2008):Integral Assessment of Estrogenic Potentials in Sediment-Associated SamplesPart II: Study of estrogen and anti-estrogen receptor binding potentials of sediment-associated chemicals under different salinity conditions using the salinity-adapted enzyme linked receptor assay.Env Sci Pollut Res <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-008-0060-x>.
- Katsiadaki I, Scott A P, Hurst M R, Matthiessen P, Mayer I (2002): Detection of environmental androgens: A novel method, based on an enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. Environmental Toxicology and Chemistry 21:1946-1954
- Kinnberg K (2003). Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. Working Report No.43, Danish Environmental Protection Agency.
- Körner W , Hanf V , Schuller W , Zwirner M , Hagenmaier H (1997): Entwicklung und praktische Erprobung eines einfachen Screening-Systems für estrogenartig wirkende Umweltchemikalien. In: 6. Statuskolloquium des Projekt „Umwelt und Gesundheit“, Herausgeber: Forschungszentrum Karlsruhe
- Kloas W, Lutz I, Einspanier R. (1999): Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro und in vivo.The Science of the Total environment 225:59-68
- Kloas W (2002): Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. Int Rev Cytol 216:1-57
- Knacker T, Schäfers C, Teigeler M, Braunbeck T (2007): Charakterisierung endokrin vermittelter Wirkungen in Fischen: Relevante Parameter für die Entwicklung einer neuen OECD-Testmethode und die Anwendung in der gesetzlichen Umweltrisikobewertung. Forschungsprojekt des Umweltbundesamtes FKZ 20667470
- Krebs F (2001): Ökotoxikologische Baggergutuntersuchung, Baggergutklassifizierung und Handhabungskategorien für Baggergut. In: Untersuchung und Bewertung von Sedimenten, Hrsg.: Calmano W, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001
- Kunz P Y, Gries T, Fent K (2006): The ultraviolet filter 3-benzylidene camphor adversely affects reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences, 93, p. 311– 321.Kunz, P.Y., Fent, K. (2006): Estrogenic activity of UV filter mixtures. Toxicology and Applied Pharmacology, 217:86 – 99
- Kunz P Y, Galicia H F, Fent K (2006): Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Estrogenic Activity of UV Filters in Fish. Toxicological Sciences 90(2):349-361
- Kunz P Y und Fent K (2009a): Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) - an analysis with nonlinear isobolograms." Toxicology and Applied Pharmacology. 234(1): 77-88.
- Kunz P Y, Kienle C, Gerhardt A (2009b): Gammarus spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment : towards integrated multilevel tests. Reviews in Environmental Contamination and Toxicology. Akzeptiert.
- Kusk K O, Wollenberger L (2007): Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disruptors in marine copepods. Ecotoxicology. 16(1): 183-95

- Länge R, Caspers N, Ensenbach U, Pallapies D, Zok S (2006): Kriterien zur Bewertung der Qualität und Validität von toxikologischen und ökotoxikologischen Studien für regulatorische Fragestellungen. UWSF-Z Umweltchem Ökotox 18:49-54
- Larkin P, Villeneuve D L, Knoebi I, Miracle A L, Carter B J, Liu L, Denslow N D, Ankley G T(2007): Development and validation of a 2000- Gene Microarray for the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). Environ Tox Chem 26(7):1497-1506
- Lattier D L, Reddy T V, Gordon D A, Lazorchak J M, Smith M E, Williams D E, Wiechman B, Flick R W, Miracle A L, Toth G P (2002): 17 α - ethinylestradiol-induced vitellogenin gene transcription quantified in livers of adult males, larvae, and gills of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environmental Toxicology and Chemistry 21(11):2385-2395
- Le Drean Y, Kern L, Pakdel F, Valotaire Y (1995): Rainbow trout estrogen receptor presents an equal specificity but a differential sensitivity for estrogens than human estrogen receptor. Molecular and Cellular Endocrinology 109:27-35
- Legler J, Dennekamp M, Vethaak D, Brouwer A, Koeman J H, van der Burg B, Murk A J (2002): Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. The science of the total environment 293:69-83
- Leon A, Wu P-S, Hall L C, Johnson M L, The S J (2008): Global gene expression profiling of androgen disruption in Qurt Strain Medaka. Environ Sci Technol 42(3), 962-969. DOI:10.1021/es071785c
- Leusch F D L, van den Heuvel M R, Chapman H F, Gooneratne S R, Eriksson A M E, Tremblay L A (2006): Development of methods for extraction and in vitro quantification of estrogenic and androgenic activity of wastewater samples. Comparative Biochemistry and Physiology: 143:117-126
- Leusch F (2008): Tools to Detect Estrogenic Activity in Environmental Waters. Global Water Research Coalition 2008
- Li C-R, Lee S-H, Kim S-S, Kim A, Lee K W, Lu M, Kim H-E, Kwak I-J, Lee Y-J, Kim D-K, Lee J-S, Kang S-W, Huh M-D, Chung K-H, Park J-S (2008): Environmental estrogenic effects and gonadal development in wild goldfish (*Carassius auratus*). Environ Monit Assess, DOI 10.1007/s10661-008-0238-1
- Manz W, Krebs F, Schipper C A, den Besten P J (2007): Dutch-German Exchange on Dredged Material: Status of ecotoxicological assessment of sediment and dredged material in Germany and The Netherlands with a short description of the situation in Belgium, France, and Great Britain. Federal Institute of Hydrology (BfG), Ministry of Transport, Public Works and Water Management (RIKZ), Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment (RIZA)
- Martyniuk C J, Gerrie E R, Popescu J T, Ekker M, Trudeau V L (2007): Microarray analysis in the zebrafish (*Danio rerio*) liver and telencephalon after exposure to low concentration of 17 α -ethinylestradiol. Aquatic Toxicology 84:38-49
- Matthiessen P (2000): Is Endocrine Disruption a Significant Ecological Issue? Ecotoxicology 9:21-24
- Metcalfe C D, Metcalfe T L, Kiparissis Y, Koenig B G, Khan C, Hughes R J, Croley T R, March R E, Potter T. (2001): Estrogenic Potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assay with Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20:297-308
- Michelini E, Leskinen P, Virta M, Karp M, Roda A (2005): A new recombinant cell-based bioluminescent assay for sensitive androgen like compound detection. Biosensors and Bioelectronics 20:2261-2267
- Moltmann J F, Liebig M, Knacker T, Keller M, Scheurer M, Ternes T (2007): Gewässerrelevanz endokriner Stoffe und Arzneimittel. Abschlussbericht des F+E-Vorhaben-FKZ 20524205 des deutschen Umweltbundesamtes
- Muncke J, Junghans M, Eggen R I L (2006): Testing Estrogenicity of known and novel (xeno-)estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). Published online in Wiley Interscience, DOI 10.1002/tox.20255
- Muncke J (2008): Der MolDarT-ein neuer Toxizitätstest. In: ZebraBärblinge-Sensoren in der Ökotoxikologie. Eawag News 64d, Eawag das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereichs
- Murk A J, Legler J, van Lipzig M M H, Meerman J H N, Belfroid A C, Spenkelink A, van der Burg B, Rijs G B J, Vethaak D (2002): Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. Environmental Toxicology and Chemistry 21:16-23
- Murk A J (2009): Effects of endocrine disruptors on early development and metamorphosis. Vortrag am 12.01.2009 am Ökotoxzentrum der Eawag, Schweiz
- Navas J M, Segner H (2006): Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti) estrogenic activity of chemical substances. Aquatic toxicology 80:1-22
- Nelson J, Bishay F, van Roodselaar A., Ikonomou M, Law F C (2007): The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. Sci Total Environ 374:80-90
- Nishi Y, Yanase T, Mu Y-M, Oba K, Ichino I, Saito M, M Nomura, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Yoshiko K, Haji M, Nawata H (2001): Establishment and Characterization of a Steroidogenic Human Granulosa-Like Tumor Cell Line, KGN, That Expresses Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptor. Endocrinology 142(1):437-445
- Nishimura N, Fukazawa Y, Uchiyama H, Iguchi T (1997): Effects of estrogenic hormones on early development of *Xenopus laevis*. The Journal of Experimental Zoology 278:221-233
- OECD Environment, Health and Safety Division Test Guidelines Programme (2005): The role and current activities of OECD on validation of testing of endocrine disrupting chemicals. http://ec.europa.eu/research/endocrine/pdf/nov2005/oecd_en.pdf
- OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment No. 60 (2006): Report of the initial work towards the validation of the 21-day Fish Screening Assay for the detection of endocrine active substances. Environment Directorate, Organisation for economic Co-operation and Development, Paris 2006
- OECD Environment Directorate (2006): Detailed review paper on aquatic arthropods in life cycle toxicity tests with an emphasis on developmental, reproductive and endocrine disruptive effects. Series on testing and assessment No. 55. ENV/JM/Mono(2006)22, JT03212400.
- OECD Environment Directorate, No. 94 (2008): Report of the validation peer review for the 21 day Fish Screening assay and agreement of the working group of the national coordinators of the test guidelines programme on the follow-up of this report. ENV/JM/Mono(2008)21, JT03249201.

- OECD Environment Directorate, No. 99 (2008): Comparison between OECD Test Guidelines and ISO standards in areas of ecotoxicology and health effects. Series on testings and assessment number 99. Joint meeting of the chemicals Committee and the working party on chemicals, Pesticides and Biotechnology. ENV/JM/Mono(2008)28, JT03255859
- OECD Environment, Health and Safety Publications (2008): Report of the validation of an enhancement of OECD TG 211: *Daphnia magna* reproduction test. Series on testing and assessment No. 93. ENV/JM/Mono(2008)20
- OECD (2009) in preparation: Receptor Binding Assay and Reporter Gene Assay in Fish
- Oikawa S, Matsumoto M (2003): Relevant activities for risk management of endocrine disruptors in Japanese government agencies. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 75:2609-2611.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U (2003): Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl. Chem.* Vol. 75:2207-2218
- Oehlmann J, Di Bendetto P, Tillmann M, Duft M, Oetken Matthias, Schulte-Oehlmann U (2007): Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. *Ecotoxicology* 16(1):29-43. DOI 10.1007/s10646-006-0109-x
- Pawlowski S, Ternes T, Bonerz M, Kluczka T, van der Burg B, Nau H, Erdinger L, Braunbeck T (2003): Combined in Situ and in Vitro Assessment of the Estrogenic Activity of Sewage and Surface Water Samples. *Toxicological Sciences* 75:57-65. DOI:10.1093/toxsci/kgf162
- Pawlowski S, Sauer A, Shears J A, Tyler C R, Braunbeck T (2004): Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*. 68:277-291
- Petit F, Valotaire Y, Pakdel F (1995): Differential functional activities of rainbow trout nad human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 233:584-592
- Pluta H J (2008a): Nachhaltiger Gewässerschutz – biologische Wirkungstests im Wasserhaushalts- und Abwasserabgabengesetz: eine Erfolgsgeschichte. Symposium am 26.2.2008 in Koblenz an der Bundesanstalt für Gewässerkunde: „Verfahren der ökotoxikologischen (Risiko-) Bewertung in der Umweltsicherung“
- Pluta H J (2008b): Benefit from standardization, regulatory and scientific requirements, procedures and participations. Vortrag an der Bundesanstalt für Gewässerkunde in Koblenz am 13-14. November zum Thema: Sediment Contact Tests Reference conditions, control sediments, toxicity thresholds
- Preston B L, Snell T W, Robertson T L, Dingmann, B J (2000): Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine Disruptors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2923-2928
- Proll G (2005): Biosensorsystem für vollständig automatisierte ultra-sensitve Multianalyt-Immunoassays. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Rasmussen T H, Nielsen J B (2002): Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-screen) *Biomarkers* 7:322-336
- Miles-Richardson S R, Pierens S L, Nichols K M, Kramer V J, Snyder E M, Snyder S A, Render J A, Fitzgerald S D and Giesy J P (1999): Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Res. Sect. A*, 80: 122-137
- Routledge E J and J P Sumpter (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(3): 241-248
- Routledge E J, Sheahan D, Desbrow C, Brighty G C, Waldock M, Sumpter J P (1998): Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environ Sci Technol* 32 :1559-1565
- RPS BKH (2002): Endocrine Disruptors: Study on gathering Information on 435 substances with insufficient data. Final Report for the European Commission, DG Environment. RPS BKH Consulting Engineers, Delft, (NL) in association with DHI Water and Environment, Horsholm (DK) and Kiwa Water Research, Nieuwegein, (NL). Project: M0355037 (Ref. : B4-3040/2001/325850/MAR/C2)
- Rutishauser B V, Pesonen M, Escher B I, Ackermann G E, Aerni H-R, Suter M J-F, Eggen R I L (2003): Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4):857-864.
- Schäfers C, Wenzel A (2000): Der Einfluss von Xenooestrogenen auf den Lebenszyklus von Fischen. In: Jahresbericht 2000, Herausgeber: Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie
- Schäfers C (2007): Wirkung endokriner Disruptoren in Fischtests: wissenschaftlicher Kenntnisstand. Vortrag auf dem Endocrine Disruptor Fish UBA-Workshop am 10./11.12.07, Berlin
- Schäfers C, Frische T, Stolzenberg H C, Weyers A, Zok S, Knacker T (2008): Zur Entwicklung einer Prüfstrategie auf sexual-endokrine Wirksamkeit einer chemischen Substanz bei Fischen. *Umweltwiss Schadst Forsch* 20:229-233. DOI 10.1007/s12302-008-0014-4
- Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Ludwichowski K U, Nagel R, Köhler H-R, Triebkorn R (2006): Bisphenol A in Artificial Indoor Streams: II. Stress Response and Gonad Histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology* 15:143-156
- Schmitt C, Oetken M, Dittberner O, Wagner M, Oehlmann J (2008): Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ Pollut* 152(2):322-329
- Schreier A (2005): Application of rainbowtrout hepatocyte cultures to study gene expression due to estrogenic compounds. PhD Dissertation des Centre of Environmental Research (UFZ) Leipzig-Halle. ISSN 1860-0387
- Schulte-Oehlmann U, Duft M, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J, Stachel B, Reincke H (2001): Biologisches Effektmontoring an Sedimenten der Elbe mit *Potamopyrgus antipodarum* und *Hinia (Nassahus) reticulata* (Gastropoda: Prosobranchia). Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe
- Schultis T, Metzger J W, (2004). Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* 57, 1649-1655
- Schwätter F, Hannich C B, Nöthe T, Oehlmann J, Fahlenkamp H (2007): Risk assessment for organic trace compounds in wastewater: comparison of conventional and advanced treatment. *Water Science & Technology*. 56 (5):9–13. DOI:10.2166/wst.2007.551.

- SEC(2007)1635, Commission Of The European Communities (2007): Commission Staff Working Document on the implementation of the “Community Strategy for Endocrine Disruptors” a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), (COM (2001) 262) and (SEC(2004)1372). Brussels 30.11.2007, SEC(2007)1635.
http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/sec_2007_1635_en.htm
- Segner H, Caroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schäfers C, Vandenberg GF, Wenzel A (2003): Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54:302-314
- Segner H (2009): Bestimmung von EDC *in situ*: Vor- und Nachteile. Abstract zum Workshop Nachweismöglichkeiten von hormonaktiven Substanzen in aquatischen Systemen am 11. +12. Juni am Oekotoxzentrum in Dübendorf in der Schweiz
- Seifert M (1999): Bestimmung von Oestrogenen und Xenooestrogenen mit einem Rezeptorassay. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften an der Technischen Universität München
- Seifert M, Haindl S, Hock B. (1999): Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. *Analytica Chimica Acta* 386: 191-199
- Sonnenschein C, Soto A M (1998) An updated review of environmental estrogens and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 65(1-6): 143-150
- Soto A M, Sonnenschein C, Chung K L, Fernandez M F, Olea N, Olea-Serrano M F (1995): The E-Screen Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. *Environmental Health Perspectives Supplements* 103 :113- 122
- Spengler P, Körner W, Metzger J W (2001) : Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical Analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:2133-2141
- Sumpter J P, Jobling S (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103:173-178
- Takeyoshi M (2006): Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation for stably transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity .The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line.
- Thomas K V, Hurst M R, Matthiessen P, McHugh M, Smith A, Waldock M J (2002): An assessment of *in vitro* androgenic activity and the identification of environmental androgens in united kingdoms estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:1456-1461
- Tyler C R, Aarle R v, Thutchinson T H, Maddix S, Trip H (1999): AN *IN VIVO* TESTING SYSTEM FOR ENDOCRINE DISRUPTORS IN FISH EARLY LIFE STAGES USING INDUCTION OF VITELLOGENIN. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(2) :337-347, DOI: 10.1897/1551-5028
- UBA-Texte 65/95 (1995):Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. Fachtagung in Berlin. UBA-Texte 65/95 ISSN 0722-186X
- US-EPA (2008): Status on EPA's Endocrine Disruptor Screening Program (August 28, 2008),
http://www.epa.gov/endo/pubs/regaspects/082808_qas.htm
- US-EPA (2009): Endocrine Disruptor Screening Program; Policies and Procedures for Initial Screening. RIN 2070-AD 61.
http://www.epa.gov/endo/pubs/revise_d_pandp_frn_041509.pdf
- van der Linden S C, Heringa M B, Man H-Y, Sonneveld E, Puijker L M, Brouwer A, van der Burg B (2008): Detection of Multiple Hormonal Activities in Wastewater Effluents and Surface Water, Using a Panel of Steroid Receptor Calux Bioassays. *Environmental Science & Technology* 42:5814-5820
- Vedani A, Spreafico M, Peristera O, Dobler M, Smiesko M (2008): VirtualToxLab-*in silico* Prediction of the Endocrine-Disrupting Potential of Drugs and Chemicals. *Chimia* 62: 322-328. Schweizerische chemische Gesellschaft. ISSN 0009-4293
- Vermeirssen E L M, Suter M J -F, Burkhardt-Holm P (2006): Estrogenicity Patterns in the Swiss Midland River Lützelalmurg in Relation to treated domestic sewage effluent discharges and hydrology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(9):2413-2422
- Vermeirssen E L M, Eggen R I L, Escher B I, Suter M J-F (2008): Estrogens in Swiss Rivers and Effluents - Sampling Matters. *Chimia* 62:389-394. ISSN0009-4293
- Watts M M, Pascoe D, Carroll K (2002): Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:445-450
- Weisbrod C J, Kunz P Y, Zenker A K , Fent K (2007): Effects of the UV filter benzophenone-2 on fecundity and reproduction in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 225:255-266
- Wilson V, Bobseine K, Earl Gray L (2004): Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists. *Toxicological Sciences* 81:69-77
- Xie L, Sapozhnikova Y, Bawardi O, Schlenk D (2004): Evaluation of Wetland and Tertiary Wastewater Treatments for Estrogenicity Using *In vivo* *In vitro* Assays. *Arch Environ Contam Toxicol* 48:81-86
- Zacharewski T (1997): *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. *Environmental Science & Technology* 31