

Tagungsberichte

COMPRENDO *Summa Summarum* – Internationale Abschlussstagung des EU-Projektes COMPRENDO (Comparative Research on Endocrine Disrupters)

Ulrike Schulte-Oehlmann

Johann Wolfgang Goethe-Universität, Institut für Ökologie, Evolution und Diversität, Abteilung Aquatische Ökotoxikologie, Siesmayerstrasse 70, D-60323 Frankfurt (schulte-oehlmann@zoology.uni-frankfurt.de)

Mehr als 130 ExpertInnen aus Politik, Ämtern, Forschungseinrichtungen, Industrie und Universitäten fanden sich am 17. März 2006 an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zusammen, um sich über die wissenschaftlichen Befunde und Schlussfolgerungen aus dem EU-Forschungsprojekt COMPRENDO zu informieren.

COMPRENDO (Comparative Research on Endocrine Disrupters, www.comprendo-project.org) wurde von der Europäischen Kommission im fünften Rahmenprogramm zu 'Forschung, Technologie und Entwicklung' gefördert und hatte unter anderem die Wirkungserfassung von androgen- und antiandrogenartigen Substanzen (AACs) an unterschiedlichen Tiermodellen zur Aufgabe. Die beteiligten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler gaben Auskunft zu den Ergebnissen ihrer mehr als dreijährigen Forschungsarbeit. Innerhalb einer Vortragsreihe gaben die Experten eine Rückschau zu den Resultaten ihrer Arbeitsschwerpunkte aus den Bereichen 'Humanexposition', 'Effekte bei Wirbellosen, Wirbeltieren und humanrelevanten Testmodellen', 'Risikobewertung' und 'Testentwicklung'

Dr. Vasilis Sakkas von der Universität Ioannina (Griechenland) stand 'Rede und Antwort' zu den Untersuchungen der Kontamination von Lebensmittelproben (Getreide, Kartoffeln, Eier, Äpfel, Butter & Öl, Fleisch, Milch, Wein & Bier, Orangensaft, Käse, Fisch und Meeresfrüchte) mit Pestiziden, Organochlor- und Organozinnverbindungen aus den beteiligten EU-Ländern (Griechenland, Spanien, Italien, Frankreich, Holland, Großbritannien, Dänemark, Schweden, Polen, Deutschland).

In 35,6% der Proben waren der Experte und seine Teamkollegen aus Italien und Frankreich in der Lage, AAC-Kontaminationen in den Lebensmittelproben nachzuweisen, wobei jedoch nur in 1,1% aller Fälle (390 Proben) die Messwerte die zulässigen Rückstandshöchstwerte für Pestizide (MRL = Maximum Residue Limit) nach EU-Richtlinie übertrafen. Auch unter Berücksichtigung der nationalen Ernährungs- und Konsumgewohnheiten konnte in diesen kritischen Fällen keine Überschreitungen der ADI (Acceptable Daily Intake)-Werte festgestellt werden. Dennoch gibt der griechische Chemiker keine generelle Entwarnung: "ADI-Werte beziehen sich auf Einzelsubstanzen, aber unsere Nahrung beinhaltet einen komplexen Cocktail von Pestizid-Rückständen oder anderen Chemikalien, und es gibt schlechthin keine Daten, die uns erlauben, abschließend darüber zu entscheiden, welche Effekte diese Stoffgemische auf die Gesundheit des individuellen Konsumenten haben könnten."

Ferner bemängelte der Analytiker, dass die derzeit gültigen Sicherheitsbestimmungen und Rückstandshöchstwerte potentiell endokrine Effekte von Chemikalien vollkommen außer Acht lassen: "Endokrine Disruptoren sind in der Umwelt weit verbreitet, haben diverse chemische Strukturen und erzeugen unter Umständen massive biologische Effekte bei extrem niedrigen

Konzentrationen, die zum Teil sogar unterhalb der chemischen-analytischen Nachweisgrenze (LOD) der aktuell verwendeten Messtechniken liegen".

Einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Umweltbedingungen, aber auch der menschlichen Gesundheit, hat COMPRENDO nach Ansicht von Prof. Jörg Oehlmann von der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt geleistet. Sein Team sowie spanische, italienische und dänische Kolleginnen und Kollegen untersuchten die Wirkungsweise von Umwelthormonen auf Invertebraten (Schnecken, Krebse und Stachelhäuter) mit dem Fernziel, neuartige Biotestsysteme zum Nachweis der Xenohormone zu entwickeln und diese auf der Ebene des OECD Richtlinien-Programms zur Testung von Chemikalien einzubringen. Der larvale Entwicklungs- und Reproduktionstest mit *Acartia tonsa* (Crustacea) liegt im zweiten Entwurfstadium vor und ist mittlerweile in der Validierungsphase. *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca) wurde von der 'Ad hoc Expert Group On Invertebrate Testing' der OECD als weiteres Testsystem in das 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disruptive Chemicals' aufgenommen. Die 'Draft Guideline' für den *Acartia*-Test ist derzeit auf dem Server der DTU (Danmarks Tekniske Universitet, <http://www.er.dtu.dk/>) abrufbar. Die SOP zum Schnecken-Test mit *Potamopyrgus* ist auf Anfrage an die Universität Frankfurt am Main erhältlich (Kontakt: schulte-oehlmann@zoology.uni-frankfurt.de).

Die von den Forschern in Laborexperimenten untersuchten Wirbellosen reagierten auf eine Exposition gegenüber den ausgewählten Xenohormonen (TBT, TPT, Linuron, Diuron, Fenarimol, Vinclozolin, p,p'-DDE) mit Effekten im umweltrelevanten Niedrigkonzentrationsbereich, was zum Teil sogar neue PNEC-Werte für die Risikobewertung der verwandten Testsubstanzen mit sich brachte. Dabei zeigten die beobachteten Effekte eine erstaunliche Übereinstimmung für alle untersuchten Invertebratengruppen. Darüber hinaus ließen sich auch Ähnlichkeiten mit den für Wirbeltiere beschriebenen Beeinträchtigungen auf die Fortpflanzung, Entwicklung, Physiologie und histopathologische Veränderungen erkennen.

"Diese Parallelen zwischen beobachtbaren Effekten bei Wirbeltieren und Wirbellosen lassen auf die Existenz von extrem konservativ gestalteten Anteilen im endokrinen System im Tierreich schließen," gibt die Biologin Dr. Susan Jobling (Brunel-Universität, Großbritannien) zu bedenken. Die Wissenschaftlerin sieht bei den Wirbellosen für viele Fragestellungen eine interessante Alternative zur Chemikaliertestung mit Wirbeltieren und weist auf die geplante Umsetzung der EU Gesetzgebung hin, die ab dem Jahr 2009 ein Verbot für Versuche mit Wirbeltieren in der Kosmetikindustrie und ab 2013 ein Totalverbot vorsieht: "Tierversuche sind ein sensibles Thema und die Öffentlichkeit hat ihre Bedenken nachdrücklich zum Ausdruck gebracht", so die Expertin.

"Welche Beweise gibt es, dass die beobachteten Effekte in den COMPRENDO Invertebraten-Studien tatsächlich das Ergebnis einer endokrinen Disruption sind," fragt sich der Frankfurter Ökotoxikologe Jörg Oehlmann. Schon im Zuge des Studiendesigns sind vor allem Endpunkte, die unter endokriner Kontrolle stehen, berücksichtigt worden. Alle beobachteten Effekte wurden von Veränderungen im Sexualsteroidtiter begleitet, eine 'Co-Exposition' von Androgenen und Anti-Androgenen führte zur Aufhebung oder Abschwächung der Effekte. Die physiologischen Untersuchungen von Prof. Werner Kloas (Leibniz-Institut für Gewässerökologie, Berlin) und MitarbeiterInnen ergaben eindeutige Hinweise auf die Existenz eines Androgen- und Östrogen-Rezeptor-Analogons bei Invertebraten. So war der Berliner Endokrinologe in der Lage, mit Hilfe von kompetitiven Verdrängungs-Assays androgen- und östrogenspezifische Bindungsstellen in Gewebehomogenaten von Stachelhäutern, Krebsen (keine 'ER'-Analoge) und Schnecken nachzuweisen. Seine Resultate wurden von Kollegin Dr. Susan Jobling durch molekularbiologische Untersuchungen, die auf die Rezeptoridentifizierung bei den eingesetzten Wirbellosen abzielen, verifiziert. "Wir haben den Nachweis für das Vorkommen eines Östrogenrezeptors bei der Apfelschnecke *Marisa cornuarietis* und östrogenabhängig agierender Rezeptoren bei allen drei von uns untersuchten Invertebratengruppen – die Funktion dieser Rezeptoren ist bisher jedoch nicht eindeutig abgeklärt," erläutert Jobling.

Werner Kloas zeigt sich begeistert von den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit dem LimnoMar Hamburg. Der Experte war im COMPRENDO Team unter anderem für die Durchführung von tierexperimentellen Studien mit Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) und Rotfedern (*Rutilus rutilus*) als Vertreter der aquatischen Wirbeltiere verantwortlich. In diesem Zusammenhang konnten Kloas und Kollegen feststellen, dass gerade bei indirekten, über die Inhibition der Aromatase vermittelten Effekten, die histologischen Untersuchungen auf der Ebene der Keimdrüsen einen wesentlich sensitiveren Endpunkt darstellten, als die makroskopische Erhebung des Geschlechterverhältnisses.

Dr. Konstanze Grote (Charité Universitätsmedizin, Berlin) untersuchte die Auswirkungen der Organozinnverbindungen TPT und TBT auf die sexuelle Entwicklung und Fortpflanzungsfähigkeit bei juvenilen Ratten (Pubertal Rat Assay), als Beispiel eines humanrelevanten Tiermodells im Forschungsprogramm des Projektes. Ganz ähnlich wie die Invertebraten reagierten auch die Nager nach oraler Verabreichung der Fungizide mit Störungen im Hormonstoffwechsel und Veränderungen auf Ebene der Keimzellen.

"Auf zellbiologischer Ebene müssen wir zwischen den zytotoxischen Effekten, bedingt durch den Einsatz von hohen Konzentrationen der Testsubstanzen, und Effekten, die in Abhängigkeit von der Interaktion mit dem Hormonrezeptor zu beobachten sind, unterscheiden", erläutert Prof. Stina Oredsson von der Universität Lund (Schweden). Die schwedische Zellbiologin untersuchte die Wirkung hormonell aktiver Chemikalien an ER/AR-positiven (MCF7, LNCap-FGC) und -negativen (SK-BR-3, PC-3) menschlichen Brust- und Prostatakrebszelllinien. Zu den Effekten, die sie beobachtete, gehörte vor allem ein auffälliger Anstieg der Zellgröße bei Exposition rezeptorpositiver Zelllinien gegenüber androgenartig wirkenden Substanzen im Niedrig-Dosisbereich. "Dabei handelt es sich um einen anabolen Effekt auf die Zelle, wobei nicht auszuschließen ist, dass, falls diese Beobachtungen ebenfalls *in vivo* auftre-

ten, letztere auch Auswirkungen auf die gewebliche Homöostase haben werden", urteilt die Zellforscherin.

"Die toxikologische Datenbasis zur Bewertung der im COMPRENDO-Projekt untersuchten Xenohormone hat sich bedeutend erhöht," berichtet Prof. Ole Kusk von der Technischen Universität Dänemark. In diesem Zusammenhang konnte der dänische Ökotoxikologe für sechs von sieben untersuchten Chemikalien eine Berechnung zu den Risikofaktoren im limnischen Milieu, für drei im marinen Milieu anstellen. Für fünf dieser Stoffe ergaben sich einen Risikofaktoren >1 für Süßwasserökosysteme sowie für alle drei Werte >1 für die marine Umwelt und damit Hinweise auf eine Gefährdung. Für die Chemikalien Fenarimol, TPT, Linuron und p,p'-DDE erbrachten die im COMPRENDO Projekt durchgeführten chronischen Expositionstests, die z.T. auch Life-Cycle- und 2-Generationen-Tests einschlossen, wesentlich niedrigere Effektkonzentrationen als bisher in der Literatur beschrieben. "Diese niedrigen Effektkonzentrationen waren die bestimmenden Faktoren bei der Risiko-Bewertung der Substanzen, die letztlich zur Berechnung niedriger PNECs (Predicted No Effect Concentrations) und höherer Risikofaktoren führten," so der Experte. Dass die Analysen nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung von Risikofaktoren führen, zeigte sich am Beispiel der Chemikalie Vinclozolin. Durch die Berücksichtigung zusätzlicher trophischer Ebenen und daraus resultierend niedrigerer 'Assessment-Faktoren' ergaben die in COMPRENDO gewonnenen Daten einen niedrigeren Risikofaktor für das limnische Milieu.

Zu den integralen Bestandteilen des COMPRENDO-Arbeitsprogramms zählte auch die Entwicklung eines Gen-Arrays unter der Federführung von Prof. Charles Tyler (Universität Exeter, Großbritannien). Obwohl sich die Arbeit als komplex erwies, liegt mittlerweile ein Prototyp des Gen-Chips auf Basis mehrerer Fischarten vor. In einer ersten Validierungsphase, in der der Molekularbiologe seine Fische gegenüber dem Aromatase-Hemmer Fenarimol exponierte, konnte er die Funktionsweise des Arrays überprüfen. Weibliche Individuen reagierten hier mit einer geringeren Expression von Zona Pellucida-Genen in reifen Oocyten sowie von Genen, die an der Differenzierung von Keimzellen und der Regulation der Steroidbiosynthese beteiligt sind. Bei männlichen Tieren ließen sich die gleichen Beobachtungen für Gene, die für die männliche Keimzellentwicklung verantwortlich sind, machen. "Die molekularen Antworten auf eine Fenarimol-Exposition stimmen hervorragend mit unseren Beobachtungen auf der phänotypischen Ebene überein und machen einen vielversprechenden Eindruck im Hinblick auf die Anwendung molekularer Marker zur Abschätzung biologischer Effekte von androgen- und antiandrogenartig wirkenden Substanzen," folgert Prof. Tyler.

Forschungsbedarf sieht das Konsortium trotz intensiver Forschungsaktivitäten und positivem Abschluss des Projektes vor allem im Bereich von Freiland- und Biomonitoring-Studien auf unterschiedlichen Ebenen der Biodiversität. Auch im Hinblick auf die Funktionsweise des endokrinen Systems von Invertebraten bestehen weitere Erkenntnislücken. Weiterhin sollten vergleichende Untersuchungen zu den Überschneidungen bei der Anamnese und Übertragbarkeit von Erkrankungen bei Mensch und Tier intensiviert werden, denn gerade die jüngsten Entwicklungen haben gezeigt, dass eine Infektion des Menschen mit typischen Tierkrankheiten (z.B. BSE, aviäre Influenza, Anthrax, Toxoplasmose, Brucellose) nicht auszuschließen sind.

Weitere Informationen, Publikationen und die Vorträge der ReferentInnen sind auf der Projekt-Homepage (www.comprendo-project.org) zu finden.