



Leitfaden

Gefährdungsbasiertes Risikomanagement
für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung
der Trinkwasserversorgung (Tox Box)

Tamara Grummt, Thomas Braunbeck, Henner Hollert, Meike Kramer



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



FONA
Nachhaltiges
Wassermanagement
BMBF

Vorwort	2
1. Einleitung	4
1.1 Theoretisches Konzept zur Ableitung der gesundheitlichen Orientierungswerte (GOW-Konzept)	4
1.2 Experimentelle Ausgestaltung des GOW-Konzeptes	6
2. Modul Gentoxizität	8
2.1 Definition des Wirkmechanismus und wissenschaftliche Grundlagen	8
2.2 Stand der Regulation	8
2.3 Teststrategie zur Bewertung von Gentoxizität	9
2.4 Testprotokolle der einzelnen Testverfahren und Ergebnisbewertung	16
3. Modul Neurotoxizität	21
3.1 Definition des Wirkmechanismus und wissenschaftliche Grundlagen	21
3.2 Stand der Regulation	23
3.3 Teststrategie zur Bewertung von Neurotoxizität	24
3.4 Testprotokolle der einzelnen Testverfahren und Ergebnisbewertung	26
4. Modul endokrine Wirkungen	36
4.1 Definition des Wirkmechanismus und wissenschaftliche Grundlagen	36
4.2 Stand der Regulation	38
4.3 Teststrategie zur Bewertung endokriner Wirkungen	39
4.4 Testprotokolle der einzelnen Testverfahren und Ergebnisbewertung	42
5. Häufig gestellte Fragen (FAQ) zum GOW	46
6. Danksagung	51
7. Abkürzungsverzeichnis	52
8. Verfügbarkeit der Protokolle der genannten Nachweisverfahren	54
Impressum	57

Vorwort

Die Anforderungen an die Trinkwasserqualität sind in der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) festgelegt. Das Trinkwasser soll nach § 1 der TrinkwV dem Verbraucher genusstauglich und so rein wie möglich zur Verfügung stehen. Modernes Leben hinterlässt auch in gut geschützten Wasserressourcen Spuren. Es sind unter anderem diese anthropogenen Spurenstoffe, die das Trinkwasser und damit die menschliche Gesundheit nachteilig beeinflussen können. Obwohl anthropogene Spurenstoffe häufig nur in geringsten Konzentrationen (deshalb die Bezeichnung „Spurenstoffe“) im Trinkwasser enthalten sind, sind diese selbst bei toxikologischer Unauffälligkeit im Trinkwasser unerwünscht.

Anthropogene Spurenstoffe werden derzeit nicht über die TrinkwV geregelt, jedoch ist in

§ 6 Absatz 3 das sogenannte Minimierungsgebot verankert. Dies sieht vor, „dass die Konzentrationen chemischer Stoffe, die das Trinkwasser verunreinigen oder seine Beschaffenheit nachteilig verändern, so niedrig gehalten werden, wie dies nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik mit vertretbarem Aufwand und unter Berücksichtigung von Einzelfällen möglich ist.“

Als Grundlage aller Regelungen ist gemäß § 4 (Abwesenheit einer gesundheitlichen Besorgnis) zu ermitteln, ob eine Schädigung der menschlichen Gesundheit durch den neu analysierten Stoff auszuschließen ist. Nach der chemischen Identifizierung eines anthropogenen Spurenstoffes im Trinkwasser in Konzentrationen oberhalb des allgemeinen Vorsorgewertes (VWa) von 0,1 µg/L muss eine Bewertung des Stoffes vorgenommen werden, um das hohe Schutzniveau in Bezug zum Trinkwasser zu gewährleisten. Diese Bewertung muss bei Auftreten des Stoffes auch auf Basis einer nicht vollständigen toxikologischen Datengrundlage vorgenommen werden. Das Umweltbundesamt (UBA) hat hierzu mit der Empfehlung „Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im

Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht“ (Umweltbundesamt 2003) das theoretische Konzept entwickelt, das dieser Bewertung zugrunde liegt.

Um eine gesundheitliche Auswirkung von Stoffen zu erkennen, werden als bewertungsrelevante Wirkmechanismen von Stoffen die Endpunkte Gen-, Neuro-, Immuntoxizität und endokrine Wirkungen eingestuft. Das heißt im Umkehrschluss, dass die Anwesenheit von Stoffen mit diesen Wirkprofilen im Trinkwasser besonders unerwünscht ist. Darin kommt ein Qualitätsanspruch zum Ausdruck, der nicht allein auf die Abwehr bekannter und quantifizierbarer Gefährdungspotenziale abstellt, sondern zugleich auf die Vorsorge gegen solche Gefährdungspotenziale.

Gleichzeitig ist zu realisieren, dass in der Therapieentwicklung von adversen Effekten dieser Wirkungen (u. a. Krebs, neurodegenerative Krankheiten) in den nächsten Jahren keine deutlichen Fortschritte zu erwarten sind. Aus diesem Grunde steht die Minimierung von Schadstoffen mit diesen Wirkprofilen an erster Stelle.

Für die Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen wird im Trinkwasserbereich das Konzept der gesundheitlichen Orientierungswerte (GOW) angewandt, die sich in ihrer Ableitung u. a. auf diese für das Trinkwasser bewertungsrelevanten Wirkmechanismen der Toxizität beziehen.

Der vorliegende Leitfaden „Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung“ soll erstmalig die Voraussetzung schaffen, nach harmonisierter Vorgehensweise Wirkmechanismen experimentell zu erfassen und entsprechend gesundheitliche Orientierungswerte für das Trinkwasser abzuleiten. Das erlaubt eine zeitnahe Bewertung der Stoffe sowie eine zügige Festlegung von Maßnahmenoptionen und deren Überprüfung durch Monitoringprogramme.

Dazu werden endpunktbezogene Teststrategien aufgezeigt. Die Ausgestaltung dieser Strategien (u. a. Testprotokolle, Bewertungskriterien) wird im nachfolgenden Textteil unter den Modulen Gen-, Neurotoxizität und endokrine Wirkungen beschrieben. Inhaltlich beschränkt sich der Leitfaden auf die Charakterisierung der Wirkmechanismen, die im GOW-Konzept als Bewertungsgrundlage herangezogen werden.

Es werden der Stellenwert des zu bewertenden Endpunktes für die menschliche Gesundheit sowie die derzeitigen wissenschaftlichen und regulatorischen Entwicklungen erläutert. Der Leitfaden zeigt transparent die Entscheidungsgrundlage des UBA bei der Ableitung von GOWs für Behörden, Wasserversorger und die interessierte Öffentlichkeit. Dadurch wird die

Akzeptanz nicht nur hinsichtlich des Vorsorgeprinzips, sondern auch in Bezug zu einer angemessenen Kosten-Nutzen-Abwägung bei allen Beteiligten erhöht.

Der Leitfaden ist ein Ergebnis des Verbundvorhabens Tox-Box (Förderkennzeichen: 02WRS1282A – 02WRS1282I) innerhalb der Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf (RiSKWa)“.
(www.bmbf.riskwa.de/index.php)

Dr. T. Grummt
Koordination des Verbundvorhabens „Tox-Box“
UBA, Fachgebietsleiterin II 3.6 „Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers“

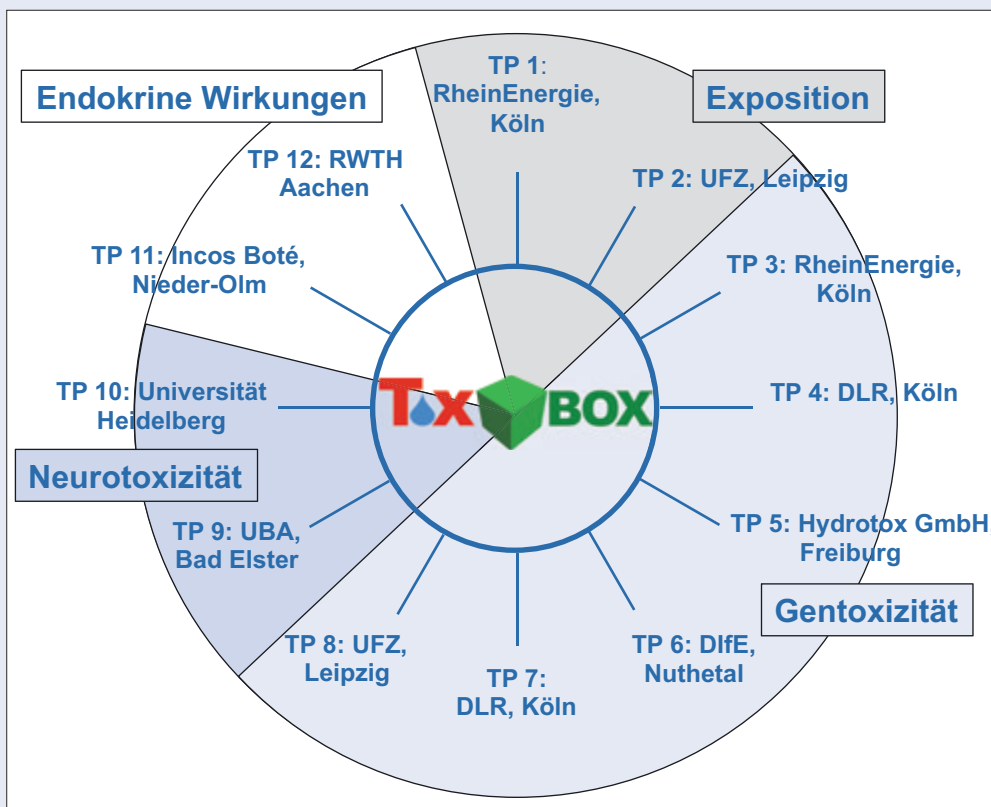


Abbildung 1: Projektpartner im Tox-Box-Verbundvorhaben

1 Einleitung

Die Zahl der unregulierten Sachverhalte im Trinkwasser wird mit der Zunahme der Einträge anthropogener Spurenstoffe und mit der Entwicklung der analytischen Verfahren weiterhin stark ansteigen. Für die neu detektierten Substanzen liegen in der Mehrzahl der Fälle keine oder nur unzureichende toxikologische Daten vor. Eine vollständige toxikologische Bewertung im konventionellen Sinne (Vorhandensein von Tierversuchstudien) ist daher nicht möglich. Dennoch besteht die Notwendigkeit, diese Substanzen hinsichtlich ihres gesundheitlichen Gefährdungspotenzials zu bewerten. Das UBA hat darauf bereits 2003 nach Anhörung der Trinkwasserkommission des damaligen Bundesministeriums für Gesundheit und soziale Sicherheit (BMGS) mit der Empfehlung „Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht“ reagiert (Umweltbundesamt 2003). In der Umgangssprache wird die Empfehlung als „GOW-Konzept“ bezeichnet.

Dieser Bewertungsansatz hat sich in der Praxis bewährt und wird von den verschiedenen Gruppen (z. B. Gesundheitsbehörden, Wasserversorger, Konsumenten) akzeptiert. Damit steht ein Instrument zur Verfügung, mit dem ereignisbezogen und zeitnah eine Abschätzung von unmittelbaren gesundheitlichen Gefährdungspotenzialen möglich ist. Mit den darauf basierenden Maßnahmenoptionen kann die Sicherheit der Trinkwasserversorgung gewährleistet werden. Gleichzeitig wird durch die harmonisierte Vorgehensweise im administrativen Bereich Handlungssicherheit für die Gesundheitsämter in Zusammenarbeit mit den Wasserversorgern gegeben.

Falls die Stoffkonzentration oberhalb des GOWs liegt, sollten Maßnahmen zur Verbesserung der human-toxikologischen Bewertbarkeit angestrebt werden. Gleichzeitig prüft das Gesundheitsamt in Zusammenarbeit mit dem Wasserversorgungsunternehmen und den zuständigen Behörden mögliche Maßnahmen zum Ressourcenschutz mit dem Ziel, die Kontamination des Rohwassers durch trinkwasser- bzw. wasser-

werksgängige Umweltkontaminanten zu minimieren bzw. zu verhindern. Sobald absehbar ist, dass ein auf der Grundlage einer verbesserten toxikologischen Datenbasis abgeleiteter, lebenslang gesundheitlich akzeptierbarer Leitwert innerhalb des vorgegebenen Zeitraums durch Maßnahmen des Ressourcenschutzes nicht einzuhalten sein wird, sind vom Wasserversorgungsunternehmen geeignete technische Maßnahmen, z.B. zusätzliche Aufbereitungsstufen oder Verbesserungen im Verteilungsnetz, einzuleiten. Mit Ableitung eines Leitwertes verliert der GOW seine Gültigkeit. Obwohl der Leitwert in den meisten Fällen höher ausfällt als der GOW, gilt dennoch aus trinkwasserhygienischen Gesichtspunkten das Minimierungsgebot unter Berücksichtigung der allgemein anerkannten Regeln der Technik.

1.1 Theoretisches Konzept zur Ableitung der gesundheitlichen Orientierungswerte (GOW-Konzept)

Dieses Konzept basiert auf den stoffbezogenen verfügbaren toxikologischen Daten für humanrelevante Wirkmechanismen (u. a. Genotoxizität, Neurotoxizität). Der GOW ist ein Vorsorgewert zum Schutz der menschlichen Gesundheit und wird aus diesem Grunde immer so niedrig festgelegt, dass eine zunehmende Vervollständigung der Datenlage in der Regel zu demselben oder zu einem höheren, aber nie zu einem niedrigeren Wert führt (Dieter 2014). Für eine detaillierte Beschreibung des theoretischen GOW-Konzeptes wird auf die UBA-Empfehlung „Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht“ verwiesen (Umweltbundesamt 2003).

Die Abbildung 2 zeigt die hierarchische Festlegung des GOW. Beim Fehlen toxikologischer Daten genügt der GOW1 von 0,1 µg/L der Mindestanforderung im § 6 (1) TrinkwV 2001, demgemäß selbst von lebenslangem Genuss eines möglicherweise belasteten Trinkwassers kein Anlass für eine gesundheitliche Besorgnis ausgehen darf.

Gentoxisch & relevanter Mechanismus?	JA	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN
Gentoxisch?		JA/keine Daten	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN
Immun- und/oder Neurotoxisch?			JA/keine Daten	NEIN	NEIN	NEIN
Subchronische Toxizität?				JA/keine Daten	NEIN	NEIN
Chronische Toxizität?					keine Daten	NEIN
Besorgnisbereich					3,0 (GOW ₄)>	3,0
				1,0 (GOW ₃)		
			0,3 (GOW ₂)			
		0,1 (GOW ₁)				
Gesundheitlicher Orientierungswert [$\mu\text{g/L}$]	$\leq 0,01$ (GOW ₀)					
Vorsorgebereich						

Abbildung 2: Theoretisches Konzept zur Ableitung Gesundheitlicher Orientierungswerte modifiziert nach Dieter (pers. Mitteilung)

Da sich aus der Höhe des GOW in der Konzentrationsspanne von 0,01 $\mu\text{g/L}$ bis > 3,0 $\mu\text{g/L}$ auch die eventuellen Maßnahmen zur Minimierung der Schadstoffe ergeben, werden mit der Erweiterung des theoretischen Konzeptes durch experimentelle Teststrategien die wissenschaftlichen Grundlagen durch den Einbau der modernen methodischen Entwicklung in die Toxikologie erweitert. Damit wird auch der Forderung einmal mehr Rechnung getragen, wonach das Risikomanagement auf einer möglichst belastbaren wissenschaftlichen Datenbasis erfolgen sollte. In jüngster Zeit sind auf dem Gebiet der *In-vitro*-Toxikologie enorme Fortschritte zu verzeichnen. Das hat allerdings bisher keinen entscheidenden Einfluss auf die Bewertungsstrategie genommen. Mit diesem Leitfaden wird das

theoretische Konzept zur Ableitung der GOW auf der Basis konventioneller Bewertungsstrategien dem wissenschaftlichen Fortschritt angepasst.

Endokrine Wirkungen fehlen im ursprünglichen GOW-Konzept. Aufgrund der aktuellen wissenschaftlichen Entwicklungen und Kenntnisse und des hohen Mobilisierungsgrades in der Gesellschaft, schließt das Forschungsvorhaben die Implementierung der endokrinen Wirkungen in das Konzept mit ein. Die Keimzellmutagenität wird über die *In-vitro*-Gentoxizität abgeschätzt, was durch die Auswertung zahlreicher Datenbanken nahezu Konsens unter den Fachleuten auf dem Gebiet der Gentoxizität ist. Die Erfassung der endokrinen Wirkungen wird durch eine *In-vitro*-Test-

Endokrine Wirkung (spez. estrogenische Wirkung)?	JA	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN
Gentoxisch & relevanter Mechanismus?	JA	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN
Gentoxisch?		JA/keine Daten	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN
Immun- und/oder Neurotoxisch?			JA/keine Daten	NEIN	NEIN	NEIN
Subchronische Toxizität?				JA/keine Daten	NEIN	NEIN
Chronische Toxizität?					keine Daten	NEIN
Besorgnisbereich					3,0 (GOW ₄)	3,0 >
				1,0 (GOW ₃)		
			0,3 (GOW ₂)			
		0,1 (GOW ₁)				
Gesundheitlicher Orientierungswert [$\mu\text{g/L}$]	$\leq 0,01$ (GOW ₀)					
Vorsorgebereich						

Abbildung 3: Theoretisches Konzept zur Ableitung Gesundheitlicher Orientierungswerte modifiziert nach Dieter mit Ergänzung der endokrinen Wirkung (pers. Mitteilung)

batterie in das GOW-Konzept integriert. Die Abbildung 3 zeigt den Einbau und die numerische Gleichstellung mit dem GOW0, der sich aus den Wirkprofilen im Niedrigdosisbereich der endokrin aktiven Substanzen ergibt. Es muss hier erwähnt werden, dass dieser Teil des GOW-Konzeptes neben dem neurotoxischen Potenzial der Teil mit dem höchsten Anteil an Entwicklungsarbeiten ist. Hier sei nochmal auf die Flexibilität der Teststrategie zu verweisen.

1.2 Experimentelle Ausgestaltung des GOW-Konzeptes

Die traditionelle Toxikologie erlaubt nur die Prüfung einer geringen Anzahl von Substanzen, die in kostenintensiven und langfristigen Tierversuchen getestet werden müssen. Hinzu kommen oftmals inkonsistente Ergebnisse in Bezug zur menschlichen Biologie und Pathophysiologie und nicht zuletzt die ethische Diskussion. Aus dieser Sachlage heraus entwickelte sich in jüngster Zeit ein Paradigmenwechsel in der experimentellen Toxikologie, der im Report „Toxicity Testing in the 21st Century (Tox 21)“ (National Research Council 2007) beschrieben ist.

Die neue Strategie nutzt u. a. humanzellbasierte *In-vitro*-Testverfahren, die über die Identifizierung von toxikologischen Schlüsselmechanismen eine Vorhersage zur möglichen *In-vivo*-Wirkung erlauben soll. In der toxikologischen Fachliteratur wird diese Vorgehensweise als High-Throughput-Screening (HTS) bezeichnet. International laufen umfangreiche Forschungsprogramme, die folgende Ziele haben:

- die Identifizierung von *In-vitro*-Testverfahren, die Wirkmechanismen nachweisen, welche an der Ausprägung adverser Effekte beteiligt sind,
- die Erfassung von Signaturmustern von *In-vitro*-Testverfahren, die eine bessere Vorhersagbarkeit von *In-vivo*-Effekten ermöglichen,

- die Priorisierung von Stoffen für eine weitere toxikologische Untersuchung und
- die Risikobewertung hinsichtlich der Gesundheitsgefährdung durch Nutzung toxikologischer Mustererkennung bei *In-vitro*-Testverfahren.

Die Umsetzung dieser Strategie zur Erfassung der toxikologischen Sicherheit erlaubt eine Toxizitätstestung jenseits der Hochdosis-Studien (toxikologisches Risiko), die für den Umweltbereich nicht relevant sind. Die bisher nachgewiesenen Stoffmuster anthropogener Spurenstoffe belegen durchgängig Belastungen im Niedrigdosis-Bereich. Angesichts der Tatsache, dass eine „Null“-Belastung nicht erreicht werden kann, sollte bei den anthropogenen Spurenstoffen nicht das toxikologische Risiko einer Substanz, sondern deren toxikologische Sicherheit charakterisiert werden. In der experimentellen Arbeit heißt das, den Nachweis von primären Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene zu führen. In den nachfolgenden Kapiteln wird entsprechend des Verbundvorhabens „Tox-Box“ für die im GOW-Konzept genannten bewertungsrelevanten Endpunkte die inhaltliche Umsetzung – Nutzung von *In-vitro*-Testverfahren für die Erfassung und Bewertung von Gefährdungspotenzialen – dargestellt (Grummt et al., 2013).

Ausgangspunkt der Entwicklungsarbeiten ist der Umstand, dass die Wirkungen prinzipiell über Testbatterien zu erfassen sind. Das heißt, eine geringe Anzahl von *In-vitro*-Testverfahren sollte in der Lage sein, die Wirkung ausreichend sicher zu charakterisieren, so dass eine Ja /Nein-Entscheidung im Sinne des GOW-Konzeptes möglich ist. Gleichzeitig muss hier angemerkt werden, dass die Testbatterie nach dem jetzigen Kenntnisstand aufgebaut, aber generell als flexibel zu betrachten ist (Grummt et al., 2018).

Perspektiven

Die Anwendung der festgeschriebenen Bewertungsstrategie führt zu einer stärkeren Vernetzung von Regulatoren und Anwendern in der Praxis. Auch für Wasserversorgungsunternehmen wird es zunehmend wichtiger, sich eigene Kompetenzen im Bereich der Risikobewertung und der Durchführung toxikologischer Untersuchungen für den prioritären Parameter Genotoxizität aufzubauen, um die im Einzelfall getroffene Bewertung einschätzen zu können und um den Bewertungsprozess als solchen zu beschleunigen (Kramer et al., 2010). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der möglicherweise abzuleitenden, kostenaufwändigen Gegenmaßnahmen und einer vertrauensvollen

Kommunikation mit Verbrauchern, Politik und Medien von Bedeutung. Bei den hier festgeschriebenen bakteriellen Testverfahren handelt es sich um gut standardisierte Kurzzeittests, die sich auch in einem Trinkwasserlabor anwenden lassen. Weil die Fortschritte in der chemischen Analytik zum Nachweis von zunehmend mehr Stoffen in immer niedrigeren Stoffkonzentrationen führen, ermöglicht der Aufbau von Kompetenzen im Bereich Stoffbewertung und Risikoeinschätzung den Wasserversorgungsunternehmen auf diese Weise den Wechsel von der reagierenden in die agierende Position. Darüber hinaus ergeben sich Einsatzmöglichkeiten gentoxikologischer Verfahren im Rahmen der Vorfeldsicherung zum Nachweis und zur Bewertung neuer unbekannter Spurenstoffe.

Literatur:

- Dieter, H. (2014): Health related guide values for drinking-water since 1993 as guidance to assess presence of new analytes in drinking-water. In: *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. – 217, S. 117-132
- Grummt T, Kuckelkorn J, Bahlmann A, Baumstark-Khan C, Brack W, Braunbeck T, Feles S, Gartiser S, Glatt H, Heinze R, Hellweg CE, Hollert H, Junek R, Knauer M, Kneib-Kissing B, Kramer M, Krauss M, Küster E, Maletz S, Meini W, Noman A, Prantl E-M, Rabbow E, Redelstein R, Rettberg P, Schadenboeck W, Schmidt C, Schulze T, Seiler T-B, Spitta L, Stengel D, Waldmann P, Eckhardt A (2013) Tox-Box: securing drops of life – an enhanced health-related approach for risk assessment of drinking water in Germany. *Environ Sci Eur* 25:27. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-25-27>
- Grummt T, Seiler T-B, Braunbeck T, Hollert H (2018): Editorial: Special Issue “Effect-related evaluation of anthropogenic trace substances – concepts for genotoxicity, neurotoxicity and endocrine effects”. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 3945-3950
- Kramer, M., Hübner, I., Schmidt, C.K. (2010): Zur Notwendigkeit des Kompetenzaufbaus im Bereich der Risikobewertung von organischen Kontaminanten bei Wasserversorgungsunternehmen – Erprobung und Etablierung von Genotoxizitätstests bei der RheinEnergie AG. In: *Jahresbericht 2009 der Arbeitsgemeinschaft der Rhein-Wasserwerke e.V. (ARW)*, 66. Bericht: 93-112.
- National Research Council (2007) *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. The National Academies Press, Washington, DC. doi:10.17226/11970
- Umweltbundesamt (2003) Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 46:249-251 doi:10.1007/s00103-003-05

2 Modul Gentoxizität

Meike Kramer, Carsten Schmidt, Eva-Maria Prantl, Petra Rettberg, Elke Rabbow, Sebastian Feles, Stefan Gartiser, Martina Knauer, Hans-Rudolf Glatt, Walter Meini, Christa Baumstark-Khan, Luis Spitta, Christine Hellweg, Eberhard Küster

2.1 Definition des Wirkmechanismus und wissenschaftliche Grundlagen

Unter Gentoxizität versteht man die Schädigung des Erbgutes (DNA) durch chemische oder physikalische Einwirkung. Schäden am Genom resultieren aus der direkten Interaktion mit der DNA oder mit anderen zellulären Bestandteilen, die an der Weitergabe der genetischen Information beteiligt sind, z.B. mit Enzymen (Topoisomerasen, DNA-Polymerasen, DNA-Reparaturenzyme) oder dem Spindelapparat. Im Gegensatz zur Gentoxizität, die auch reversible, d.h. vor der nächsten Zellteilung reparierbare Schäden am Erbgut berücksichtigt, bezieht sich der engere Begriff der Mutagenität auf vererbare Schäden, die an die nächste Zellgeneration (Körperzellen oder Keimzellen) weitergegeben werden.

Bei der Ableitung gesundheitlicher Orientierungswerte (GOW) für toxikologisch zuvor nicht bewertete trinkwasserrelevante Stoffe ist die Gentoxizität der prioritäre Parameter (Umweltbundesamt 2003). Für die meisten Stoffe mit gentoxischer Wirkung wird ein GOW von 0,1 µg/L festgelegt. Nur für einige wenige stark gentoxische Stoffe (z.B. aus als hochgradig krebserzeugend bekannten Stoffgruppen) gilt dieser Wert nur für einen Zeitraum von maximal 10 Jahren als sicher. Für gentoxische Stoffe mit adäquatem Stoffwechsel gilt ein GOW von 0,01 µg/L.

Bewertungsrelevant im Sinne des GOW-Konzeptes sind nicht die anthropogenen Spurenstoffe, für die bereits aus der Zulassung gentoxikologische Daten vorliegen (z.B. Pflanzenschutzmittel, Arzneistoffe, Industriechemikalien), sondern die Vielzahl an Metaboliten und Transformationsprodukten, die über Kläranlagen oder diffuse Quellen in den Wasserkreislauf eingetragen werden und aufgrund ihrer polaren Eigenschaften bis ins Rohwasser oder sogar Trinkwasser gelangen, oder erst während der Wasseraufbereitung (Chlorung, Ozonung) aus Vorläuferstoffen entstehen.

2.2 Stand der Regulation

Für eine adäquate Bewertung des gentoxischen Potenzials einer chemischen Substanz müssen mindestens drei unterschiedliche Endpunkte, nämlich die Induktion von Genmutationen, Änderungen der Chromosomenstruktur (Klastogenität) und numerische Chromosomenveränderungen (Aneuploidie) beurteilt werden, da jedes dieser Ereignisse in die Entstehung von Krebs bzw. von vererbaren Krankheiten involviert sein kann.

Üblicherweise werden verschiedene Testverfahren zu einer Testbatterie zusammengestellt und gemeinsam bewertet, da es keinen einzelnen Test gibt, der alle gentoxikologisch relevanten Endpunkte abbilden kann. Zur Bewertung des gentoxischen Potenzials hat sich in der Chemikalien testing eine international harmonisierte, hierarchische Teststrategie etabliert, bei der *In-vitro*-Testverfahren die erste Bewertungsstufe darstellen. Die gewonnenen Befunde können bei nicht eindeutiger Datenlage anschließend in einer Bewertungsstufe *in vivo* verifiziert werden. Die Auswahl der Testverfahren geschieht dabei endpunktbezogen. Die für die *In-vitro*-Teststufe empfohlenen Tests unterscheiden sich in einschlägigen Regelwerken nur geringfügig. Nachfolgende Auflistung zeigt eine Testempfehlung am Beispiel der WHO-Kriterien nach Eastmond et al. (2009):

- Genmutationen in Bakterien
 - z.B. Ames-Test mit fünf Teststämmen entsprechend der OECD Richtlinie 471.
 - Anwendung weiterer Teststämmen in Abhängigkeit von der chemischen Struktur und der Substanzklasse.
- Chromosomenmutationen in Säugetierzellen
 - z.B. Chromosomenaberrations-Test
 - z.B. Mikrokern-Test

- Zellmutationen in Säugetierzellen
 - z.B. Mouse-Lymphoma-Thymidin-Kinase-Test
 - z.B. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test

In Abhängigkeit vom regulatorischen Kontext wird ein Stoff, der in der *In-vitro*-Testbatterie negativ ist, bereits als nicht gentoxisch eingestuft (z. B. REACH, CLP, Kosmetikrichtlinie). Wenn allerdings ein hohes oder verlängertes Expositionsniveau für den Menschen zu erwarten ist (z.B. bei den meisten Humanarzneimitteln), werden auch Stoffe, die in der Stufe 1 negativ waren, anschließend mit *In-vivo*-Tests überprüft, um zusätzliche Sicherheit zu gewährleisten (z.B. ICH für Arzneimittel, VICH für Tierarzneimittel).

Obwohl allgemeiner Konsens bei Zulassungsverfahren darüber besteht, dass bei der Gentoxizitätsprüfung aus Gründen der Bewertungssicherheit für die menschliche Gesundheit auf Tierversuche nicht gänzlich verzichtet werden kann, bestehen seitens der Europäischen Union Bestrebungen, die Aussagekraft der *In-vitro*-Testbatterie so weit zu verbessern, dass möglichst wenige *In-vivo*-Nachuntersuchungen erforderlich sind (Corvi et al. 2013).

Um falsch-positive Effekte, die unnötige Nachuntersuchungen bedingen, möglichst zu vermeiden, sollte das Screening zunächst auf einer eng begrenzten Anzahl von Tests basieren, die gleichzeitig gut validiert und informativ sind (Kirkland et al., 2007).

Kirkland et al. (2011) postulierten in diesem Zusammenhang auf der Grundlage einer umfangreichen Literaturlauswertung eine Basis-Testbatterie, die nur aus zwei *In-vitro*-Tests, dem klassischen Ames-Test mit fünf Teststämmen gem. OECD-Richtlinie 471 und dem Mikrokern Test besteht. Beide Testsysteme würden demnach gemeinsam 73 % der untersuchten Nagetier-Karzinogene und 78 % der *In-vivo*-Gentoxine erkennen. Während der Ames-Test mit Bakterienzellen (prokaryotisches System) durchgeführt wird,

verwendet der Mikrokern-Test Säugerzellen (eukaryotisches System). Beide Testsysteme werden seit vielen Jahren standardisiert angewendet und decken gemeinsam alle auf der *In-vitro*-Ebene relevanten toxikologischen Endpunkte ab. Der Ames-Test identifiziert Genmutationen, während der Mikrokern Test größere strukturelle Schäden der DNA (Klastogenität) und Änderungen der Zahl der Chromosomen (Aneuploidie) erkennt (Kirkland et al. 2011, COM 2011).

Um Informationen über den verantwortlichen gentoxischen Wirkmechanismus zu ermöglichen und gleichzeitig Hinweise auf falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse zu erhalten und zu verifizieren, sind zusätzliche *In-vitro*-Tests erforderlich. Als zielführend wird u.a. der Einsatz spezifischer Zusatz-Tests oder Test-Varianten betrachtet, deren Auswahl sich an speziellen Struktureigenschaften der Zielsubstanz orientiert (Kirkland et al. 2007, Reifferscheid & Buchinger, 2010). Somit kommt der Strukturanalyse eine große Bedeutung zu. Dabei handelt es sich um *In-silico*-Modelle, die die Vorhersage gentoxischer Eigenschaften aufgrund von bestimmten Unterstrukturen, den funktionalen Gruppen oder Toxikophoren, ermöglichen. Teilweise können valide Datenbanksysteme genutzt werden.

2.3 Teststrategie zur Bewertung von Gentoxizität

Zur Einschätzung des gentoxischen Potenzials von Trinkwasserkontaminanten im Rahmen des GOW-Konzeptes ist ein möglichst schnelles Bewertungsverfahren angezeigt. Bisher war die Vorgabe festgeschriebener Testverfahren zur Prüfung der bewertungsrelevanten Endpunkte ein offener Punkt des GOW-Konzeptes. Die entwickelte Testbatterie ermöglicht nun die schnelle und zielführende Bewertung des prioritären Parameters Gentoxizität. Sie konzentriert sich auf die *In-vitro*-Teststufe, ermöglicht aber dennoch eine hohe Aussagekraft im Hinblick auf humanrelevante Gentoxine (Abbildung 4). Die damit

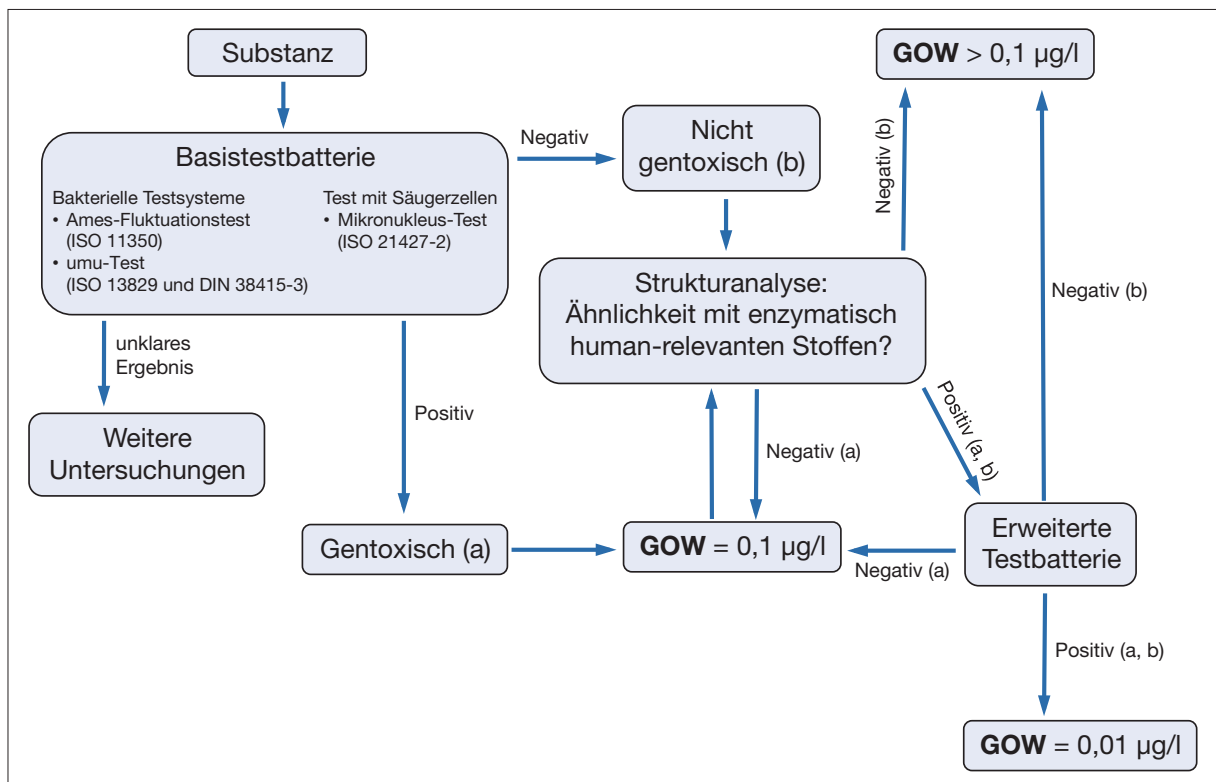


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Teststrategie für den Parameter Gentoxizität. Für eine Substanz, die in der Basistestbatterie als „gentoxisch“ eingestuft wurde, ergeben sich in der nachfolgenden Bewertung nach GOW andere Ableitungswege (a), als bei einer Substanz, die in der Basistestbatterie als „nicht gentoxisch“ eingestuft wurde (b).

verbundene Beschleunigung des Bewertungsprozesses ermöglicht den beteiligten Wasserversorgungsunternehmen und Gesundheitsbehörden die zeitnahe Entscheidung darüber, ob weitergehende technische Maßnahmen zur Verminderung der Kontamination angezeigt sind und erleichtert somit auch die Kommunikation mit der Öffentlichkeit.

Im Vorfeld kann in einer ausführlichen Strukturanalyse geprüft werden, ob die Testsubstanz funktionelle Gruppen enthält, die im Säugetierstoffwechsel zu einer gentoxischen Wirkung führen können, ohne mit der Basis-Testbatterie erkannt zu werden. Die Basis-Testbatterie aus wenigen, aber auf hohem Niveau

standardisierten Tests, erfasst dann alle bewertungsrelevanten Endpunkte mit vergleichsweise geringem Risiko für falsch-positive Ergebnisse (Abbildung 5). Der Einsatz zusätzlicher hochspezifischer Teststämme bzw. Zelllinien (für alle Verfahren der Basis-Testbatterie verfügbar) in der erweiterten Teststrategie ermöglicht den sensitiven Nachweis der gentoxischen Wirkung zusätzlicher Stoffgruppen..

Basis-Testbatterie

Die Basis-Testbatterie wurde entwickelt und mit Hilfe von ausgewählten, für die Trinkwassergewinnung relevanten Einzelsubstanzen validiert (Prantl et al., 2018).

Ames-Fluktuationstest	umu-Test	Mikrokern-Test
ISO 11350: 2012	ISO 13829: 2000	ISO 21427-2: 2009
Endpunkt: Genmutationen in Bakterien	Endpunkt: Induktion der DNA-Reparatur in Bakterien	Endpunkt: Chromosomenmutationen in Säugetierzellen
<u>Standard-Teststämme:</u> <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 <i>Salmonella typhimurium</i> TA100	<u>Standard-Teststamm:</u> <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/ psk 1002	<u>Standard-Zelllinie:</u> V79-Zellen (Fibroblasten des Chinesischen Hamsters)

Abbildung 5: Basis-Testbatterie aus drei *In-vitro*-Tests, die gemeinsam die bewertungsrelevanten Endpunkte Genmutation und Chromosomenmutation abbilden.

In Anlehnung an die Erkenntnisse von Kirkland et al. (2011) wurden für die Basis-Testbatterie zunächst der Mikrokern Test und der Ames-Test ausgewählt. Allerdings bezieht sich die Datenanalyse von Kirkland et al. (2011) auf die Ergebnisse des Ames-Tests mit fünf Teststämmen, die gemeinsam verschiedene Typen von Punktmutationen erfassen, wie in der OECD-Richtlinie 471 gefordert. Einen hohen Standardisierungsgrad haben die Ames-Testprotokolle der ISO-Normen für Wasser- und Abwasserproben erreicht (Ames-Platteninkorporationstests ISO 16240:2005, Ames-Fluktuationstests ISO 11350:2012), die detaillierte Vorgaben zur Testdurchführung und -auswertung machen.

Für die hier beschriebene Basis-Testbatterie wurde der Ames-Fluktuationstest ausgewählt, der aufgrund des hinterlegten statistischen Verfahrens eine höhere Bewertungssicherheit gewährleistet (Reifferscheid et al., 2011). Wie die aus dem Tox-Box-Projekt vorliegenden Untersuchungsergebnisse gezeigt haben, kann die Ergänzung des Ames-Fluktuation-Tests durch den umu-Test seine Bewertungssicherheit erhöhen (Prantl et al., 2018). Der Vorteil des umu-Tests ist, dass bei Verwendung eines einzigen Teststammes verschiedene Arten von DNA-Schäden summarisch erfasst werden können, da das *umuC*-Gen an allen wesentlichen Schritten der bakteriellen Mutagenese beteiligt ist (Oda et al., 1985, Rajagopalan et al., 1992, Little & Mount, 1982).

Die für die Basis-Testbatterie ausgewählten *In-vitro*-Verfahren zeichnen sich aus durch einen hohen Standardisierungsgrad, statistisch gesicherte Bewertungskriterien, vergleichsweise einfache Anwendung mit Automatisierungspotenzial und geringe Sicherheitsanforderungen an die Laborausstattung (S1-Labor).

Die Ergebnisse der einzelnen Tests der Basis-Testbatterie werden gemeinsam bewertet. In Abhängigkeit vom Ergebnis stehen verschiedene Handlungsoptionen zur Verfügung, um zu einer zufriedenstellenden Bewertung auf der *In-vitro*-Ebene zu gelangen. Unabhängig von der Einstufung als „positives Testergebnis“ oder „negatives Testergebnis“ wird zusätzlich immer anhand einer Strukturanalyse der Verdacht auf toxikophore Gruppen überprüft (Abbildungen 4 und 7):

■ positives Testergebnis

- a) Wenn nur im bakteriellen Testsystem, nicht aber im Mikrokern Test mit V79-Zellen ein positives Testergebnis vorliegt, kann im Einzelfall ein bakterienspezifischer gentoxischer Mechanismus vorliegen, der aufgrund von Literatordaten nachweislich keine humantoxikologische Relevanz hat. Dies betrifft z.B. die Substanzgruppe der Gyrasehemmer (z.B. Fluorchinolone), die in den Ames-Teststämmen TA 98 und TA 100 und im umu-Test, nicht jedoch im Ames-Stamm TA 102, zu gentoxischen Effekten führen (Ciaravino, et al., 1993, Clerch et al. 1992).

b) Wenn nur im Mikrokern Test mit V79-Zellen, nicht aber in den bakteriellen Testverfahren ein positives Testergebnis vorliegt und die Strukturanalyse keine Hinweise auf toxikophore Gruppen gibt, kann eine Nachuntersuchung mit einem alternativen Zellmodell sinnvoll sein. Die Fibroblastenzelllinie V79 aus dem Chinesischen Hamster zeichnet sich durch hohe Proliferationsraten, jedoch auch durch geringe metabolische Kompetenz und p53-Defizienz aus, was das Auftreten von falsch-positiven Testergebnissen begünstigt. Zur Überprüfung eignen sich humane p53-profiziente Zellen, z.B. HepG2-Zellen (+ S9-Mix) oder HepaRG-Zellen (höhere metabolische Kompetenz, aber bisher kaum Erfahrung im Routineeinsatz) aus einem humanen Hepatokarzinom.

Abbildung 6 zeigt die Bewertung der Testergebnisse schematisch.

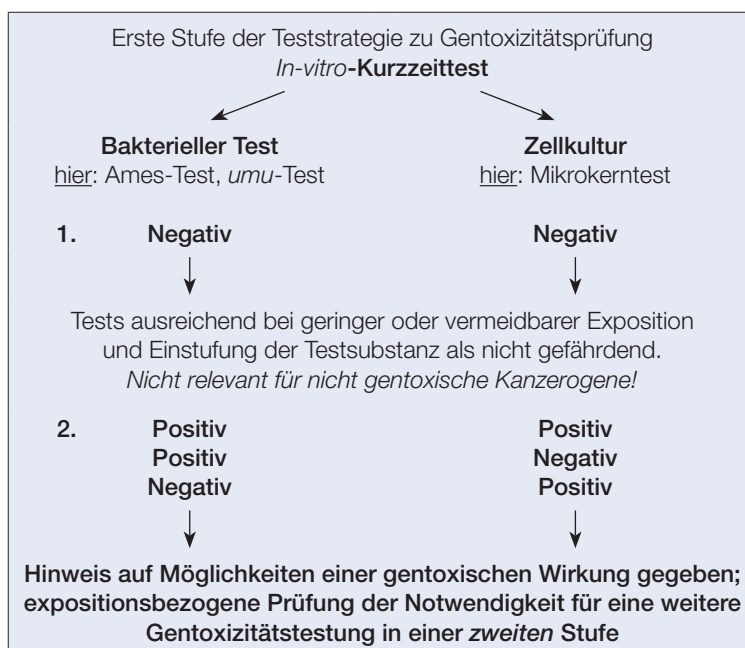


Abbildung 6: Teststrategie zur Gentoxizitätsprüfung

■ negatives Testergebnis

Ein negatives Ergebnis in allen Tests der Basis-Testbatterie reicht für eine Einstufung als „nicht gentoxisch“ nicht aus. Falsch-negative *In-vitro*-Ergebnisse können auf eine unzureichende metabolische Aktivität bzw. exogene metabolische Aktivierung der Testzellen zurückgeführt werden (Ku et al. 2007). Wenn die Strukturanalyse Hinweise auf toxikophore Gruppen gibt, müssen ergänzende Tests mit spezifischen Zusatz-Teststämmen durchgeführt werden, um den Befund abzusichern.

Speziell im Ames-Test ist der Nachweis von Nitrosaminen, bivalenten Metallen, Aldehyden, Azofarbstoffen und Diazoverbindungen, Alkaloiden, Allyl- und Nitroverbindungen ohne Modifikation des Standardverfahrens erschwert (OECD 471). Neben Teststämmen, die einzelne fremdstoffmetabolisierende Säugetierenzyme überexprimieren kann der Ames-Fluktuationstest durch weitere Teststämme gem. OECD-Richtlinie 471 ergänzt werden, die spezifische Mutationsmuster anzeigen (in der Regel GC-Punktmutationen). Besonders die Teststämme *S. typhimurium* TA 102 oder *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, die anders als die übrigen Ames-Stämme AT-Punktmutationen erfassen und wichtig für den Nachweis zusätzlicher spezifischer Stoffgruppen (z.B. Hydrazine) sind, können im Einzelfall wichtige Zusatzinformationen geben.

Erweiterte Teststrategie

Durch den gezielten Einsatz zusätzlicher Teststämmen bzw. Zelllinien, die für alle Testverfahren der Basis-Testbatterie zur Verfügung stehen, besteht im Sinne einer erweiterten Teststrategie die Möglichkeit, das Spektrum nachweisbarer Gentoxine zu erweitern und gleichzeitig Hinweise auf den verantwortlichen gen-

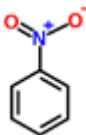
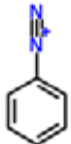
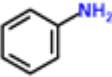


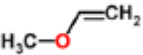
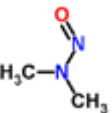
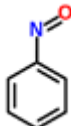
toxischen Mechanismus zu erhalten. Die Auswahl der Teststämme erfolgt aufgrund von spezifischen Struktureigenschaften der Testsubstanz.

Strukturanalyse

In-silico-Voraussagen zur Gentoxizität von Substanzen stützen sich auf empirische Daten und/oder physiko-chemische Betrachtungen. Strukturelemente, die eine toxikologische Aktivität vermitteln oder begünstigen werden als „Toxikophoren“ oder „structural alerts“ bezeichnet (Ashby 1985; Miller and Miller 1981). Eine direkte gentoxische Aktivität einer Substanz, insbesondere soweit sie auf einer unmittelbaren Interaktion mit der DNA beruht, lässt sich so recht zuverlässig abschätzen. Entsprechende Modelle wurden z.B. durch den statistischen Abgleich spezifischer Molekülstrukturen mit positiven Effekten im Ames-Test entwickelt (Benigni et al., 2008). Kazius und Kollegen (2005) zeigten in diesem Zusammenhang, dass die meisten

Ames-positiven Substanzen durch acht Toxikophoren und weitere 29 toxikophore Substrukturen (Abbildung 7) repräsentiert werden, so dass zutreffende Vorhersagen mit einem Fehler von nur 15 % gemacht werden können.

Bei der Frage, ob eine Substanz zu gentoxischen Metaboliten umgesetzt werden kann, und wenn ja, welche Enzyme die Aktivierung (und Inaktivierung) vermitteln könnten, ist dagegen nicht nur die Enzymklasse, sondern auch die kritische Enzymform gefragt. Dies ist für einzelne Substanzklassen in Kombination mit molekularen Berechnungen durchaus möglich, wenn experimentelle Daten für genügend viele Kongenere vorliegen. Schwieriger wird dies, wenn beliebige Substanzen zu beurteilen sind. Einfache etablierte Vorgehensweisen gibt es hier nicht, auch wenn die Problematik der adäquaten Berücksichtigung des Metabolismus in der Toxikologie wohl bekannt ist. Je nach Struktur einer Substanz empfiehlt es sich,

Name des Toxikophors	Beispiel	Name des Toxikophors	Beispiel
Aromatische Nitroverbindung		Diazonium	
Aromatisches Amin		β- Propiolacton	
Dreigliedriger Heterozyklus		Unsubstituiertes, α,β ungesättigtes Alkoxy	
Nitrosoverbindung		Aromatische Nitrosoverbindung	

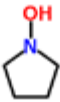
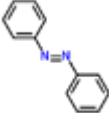

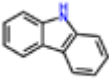
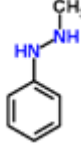
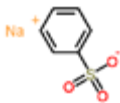
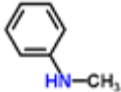

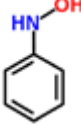
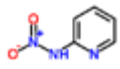
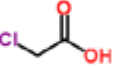
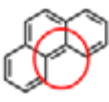
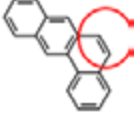
Name des Toxikophors	Beispiel	Name des Toxikophors	Beispiel
Unsubstituiertes heteroatomgebundenes Heteroatom		Azid	$\text{N}^{\ominus}=\text{N}^{\oplus}=\text{N}^{\ominus} \text{Na}^{\oplus}$
Azoform		Diazogruppe	$\text{H}_2\text{C}=\text{N}^{\oplus}=\text{N}^{\ominus}$
Aliphatisches Halogenid		Triazen	$\text{HN}=\text{N}=\text{NH}_2$
Polycyclisches aromatisches System		1-Aryl-2-Monoalkylhydrazin	
Sulfatgebundenes Kohlenstoffatom		Aromatisches Methylamin	
α , β - ungesättigtes Aldehyd		Aromatisches Hydroxylamin	
N-Nitroverbindung		Carbonsäurehalogenid	
Bay-Region		K-Region	
Alkylnitrit	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{N}=\text{O}$		

Abbildung 7: Toxikophore nach Kazius et al. (2005), verändert, Strukturformeln aus www.chemspider.com

einen Experten zur Biotransformation und/oder ein computerbasiertes System zu Rate zu ziehen. Zur Auswahl stehen hier diverse frei verfügbare Programme, die in öffentlich geförderten Projekten entwickelt wurden, u.a. OECD QSAR Toolbox (www.qsartoolbox.org/) oder UFZ ChemProp (www.ufz.de/index.php?en=34593) basierend auf dem EU-Projekt OSIRIS (<http://osiris.simplice.com/OSIRIS-ITS/itstool.do>).

Auswahl von zusätzlichen Teststämmen oder Zelllinien in Abhängigkeit von Stoffeigenschaften

Gentechnisch modifizierte Zielzellen, die einzelne fremdstoffmetabolisierende Enzyme aus dem Säugtiermetabolismus überexprimieren können, stehen für eine Auswahl an charakteristischen Enzymen zur Verfügung (z.B. Cytochrom P450 (CYP), Glutathion-S-transferase (GST), Sulfotransferase (SULT), N-Acetyltransferase (NAT)). Zur strukturabhängigen Auswahl geeigneter Zusatzstämmen können nachfolgend einige konkrete Empfehlungen ausgesprochen werden:

- a) **Kleine Moleküle (M_r < 150) und substituierte Biphenyle:** rekombinante *Salmonella*-Stämme und V79-Linien, in denen humanes Cytochrom P450 (z.B. CYP2E1) exprimiert wird.
- b) **Halogenierte Alkane, insbesondere vicinal-dihalogenierte Alkane,** sollten in Gegenwart von Glutathiontransferase GSTT1 untersucht werden. Die Arbeitsgruppe von Glatt am Deutschen Institut für Ernährungsforschung hat humane GSTT1 ebenfalls in *S. typhimurium* TA1535 und zudem in V79-Zellen zur stabilen Expression gebracht (Meinl et al.). Dies ermöglicht eine verbesserte *In-vitro*-Untersuchung der Substanzen.
- c) **Nitroalkane** (wie z.B. 2-Nitropropan) sollten in Zellen getestet werden, die eine geeignete Sulfotransferase SULT exprimieren. Verfügbar sind unter anderem *S. typhimurium*-Stämme und V79-Zellen, die die wichtigste humane SULT exprimieren, bei den V79-Zellen auch in Kombination mit CYP1A2 oder CYP2E1. Auch HepaRG-Zellen exprimieren hinreichende Niveaus von SULT.
- d) **Nitroaromaten** sollten in Gegenwart einer Reduktase mit verschiedenen Transferasen untersucht werden. Hierfür stehen geeignete *Salmonella*-Stämme zur Verfügung. In Säugerzellsystemen ist eine zuverlässige Testung von Nitroaromaten schwieriger, da im Säuger die Nitroreduktion nicht durch ein einheitliches Enzym vermittelt wird. Der Einsatz von Zusatz-Säugerzelllinien bei der Testung von Nitroaromaten ist daher nur sinnvoll, wenn mechanistische Untersuchungen angestrebt werden und die Bereitschaft zu einem hohen experimentellen Aufwand vorhanden ist.
- e) **Aromatische Amine** sollten in Gegenwart von CYP ebenfalls mit verschiedenen Transferasen untersucht werden. Dazu stehen transgene Bakterienstämme zur Verfügung. Bei der Prüfung von aromatischen Aminen in Säugerzellsystemen bietet es sich an, Zellen zu verwenden, die humanes CYP1A2 in Kombination mit humaner NAT2 co-exprimieren, und zudem Zellen, die über humane CYP1A2 und humane SULT1A1 verfügen.
- f) **Benzyliche und allyliche Alkohole** (und Substanzen die darüber metabolisiert werden können) sollten in SULT-profizienten Zellen untersucht werden. Wir empfehlen, entsprechende Substanzen nicht nur in konventionellen Zellen von Standardtests, sondern auch in SULT-exprimierenden Bakterienstämmen oder Säugerzelllinien zu testen, wobei wir der SULT1A1 Priorität wegen ihrer breiten Substrattoleranz und ihrer hohen Expression in vielen humanen Geweben einräumen. HepaRG-Zellen sind ebenfalls geeignet.

2 Modul Gentoxizität

2.4 Testprotokolle der einzelnen Testverfahren und Ergebnisbewertung

Bei der Entwicklung und Validierung der hier beschriebenen Basis-Testbatterie im Rahmen des Forschungsprojektes Tox-Box wurde streng nach ISO-Normen gearbeitet. Die Testprotokolle haben einen hohen Standardisierungsgrad erreicht, sodass bereits eine sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Laboren gewährleistet ist.

Ames-Fluktuationstest nach ISO 11350 zum Nachweis von Punktmutationen

Testprinzip: Den Testbakterien fehlt aufgrund einer einzigen Punktmutation in ihrem Genom die Eigenschaft, einen für ihr Wachstum unerlässlichen Nährstoff, die Aminosäure Histidin, selbst zu synthetisieren. Sie sind daher auf das Vorhandensein von Histidin im Nährmedium angewiesen. Da es unter der Einwirkung von Gentoxinen vermehrt zu Mutationen kommt, besteht die Möglichkeit, dass die Testbakterien durch eine einzige Punktmutation Histidin wieder selbst herstellen und entsprechend wieder in Histidin-freiem Medium wachsen können. Das Testprinzip beruht auf der quantitativen Bestimmung solcher „Rückmutanten“ (Revertanten). Die Anzahl der Bakterien, die nach der Exposition in Histidin-freiem Medium wachsen, dient als Maß für die mutagene Aktivität. Für den Ames-Test steht eine Anzahl von Teststämmen zur Verfügung, die verschiedene Mutationstypen anzeigen können, je nachdem, an welcher Stelle im Histidin-Gen sich der ursprüngliche DNA-Defekt befindet. Dadurch werden Hinweise auf unterschiedlichen Schädwirkungen erhalten. Der Ames-Fluktuationstest basiert im Gegensatz zum Ames-Platteninkorporationstest auf der Arbeit mit Flüssigkulturen im Mikrotiterplattenformat (384-Well-Platten), was eine erhebliche Material- und Zeitersparnis erlaubt. Das Wachstum von Revertanten wird durch Zugabe eines Farbindikators sichtbar gemacht.

Auswertung: Die Revertanzahl wird durch Auszählen der verfärbten Mikrotiterplatten-Kavitäten auf einer Lichtplatte „per Hand“ ermittelt. Durch die photometrische Erfassung des Farbumschlags (violett nach gelb) kann die Auswertung nach experimenteller Anpassung auf einem geeigneten Mikrotiterplattenreader automatisiert werden.

Testorganismen: Das Testprotokoll der ISO berücksichtigt die Standardstämme *Salmonella typhimurium* TA 98 und *Salmonella typhimurium* TA 100 zum Nachweis von GC-Rasterschub- beziehungsweise GC-Basenaustausch-Mutationen. Dabei handelt es sich um zwei der in der OECD-Richtlinie 471 insgesamt vorgesehenen fünf Teststämmen.

Testprotokoll: Die Testdurchführung erfolgt nach dem Testprotokoll der ISO 11350. Ergänzender Hinweis: Da die ISO 11350 keine genaue Vorgabe dazu macht, ab wann eine Wachstumshemmung als zytotoxisch zu werten ist, wurde ein Wert von 50 % festgelegt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

umu-Test nach ISO 13829 zum Nachweis der DNA-Reparaturintensität

Testprinzip: Das Testprinzip beruht darauf, dass Gentoxine infolge einer Schädigung der Erbsubstanz (DNA) das DNA-Reparatursystem der Zelle aktivieren. Der Testorganismus wurde durch Kopplung von Genen so modifiziert, dass bei DNA-Schädigung nicht nur ein bestimmtes DNA-Reparaturenzym, sondern in gleichem Maß auch ein weiteres zuckerspaltendes Enzym produziert wird, das nach Zugabe eines künstlichen Substrats den verfahrenstechnischen Nachweis mittels Farbumschlag erlaubt. Im Anschluss an die Exposition der Bakterienzellen mit der Testsubstanz kann auf diese Weise die Induktion des DNA-Reparatur-Gens photometrisch bestimmt werden. Der umu-Test ist ein Indikatorstest, der eine breite Palette unterschiedlicher DNA-Schäden erfasst. Er zeigt eine gentoxische Wirkung, aber nicht zwingend auch eine

mutagene Wirkung an, da die theoretische Möglichkeit besteht, entstandene Schäden vor der nächsten Zellteilung vollständig zu reparieren.

Auswertung: Die Auswertung erfolgt photometrisch mittels Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Wellenlängen: 600 nm, 420 nm).

Testorganismus: *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002

Testprotokoll: Die Testdurchführung erfolgt nach dem Testprotokoll der ISO 13829.

Ergänzender Hinweis: Zur Bewertung der Testergebnisse macht die ansonsten identische DIN 38415-T3 strengere Vorgaben (positive Effekte ab einer Induktionsrate $\geq 1,5$ statt $\geq 1,3$), die eine höhere Bewertungssicherheit ermöglichen.

Ergänzende Bemerkungen zur Testdurchführung

Für die Durchführung aller *In-vitro*-Verfahren der Basis-Testbatterie gelten übergeordnete Vorgaben, die im Folgenden erläutert werden. Diese umfassen beispielsweise die Anzahl der Replikate, mitzuführende Kontrollen sowie Testkonzentrationen und können der jeweiligen ISO-Norm entnommen werden.

■ **Einsatz zusätzlicher Zellsysteme**

Der hohe Standardisierungsgrad der Testprotokolle der Basis-Testbatterie gilt insbesondere in Verbindung mit den in der jeweiligen ISO-Norm beschriebenen Standard-Teststämmen bzw. -Zelllinien. Für den Einsatz von zusätzlichen Zellsystemen im Rahmen der erweiterten Teststrategie sind teilweise experimentelle Anpassungen des Testprotokolls erforderlich (z.B. bezüglich Inkubationszeit, Zelldichte, Konzentration an Nährmedium, S9-Fraktion). Zu berücksichtigen ist zudem, dass sich die Zytotoxizität einer Testsubstanz in Gegenwart von Stoffwechselaktivierungssystemen verändern kann. Daher sollte für jeden Teststamm eine

begleitende Zytotoxizitätsmessung durchgeführt werden. In jedem Fall sollte die spezifische Sensitivität der zusätzlichen Zellsysteme mit geeigneten Positivsubstanzen überprüft und eine auf dieser Basis definierte Positivkontrolle mitgeführt werden.

Mikrokern-Test nach ISO 21427-2 zum Nachweis von Chromosomenmutationen

Testprinzip: Der Mikrokern Test weist strukturelle Chromosomenschäden und Schäden am mitotischen Apparat nach. Sowohl Chromosomenaberrationen als auch Störungen im Spindelapparat führen dazu, dass Chromosomen oder Chromosomenfragmente im Zuge der Zellteilung nicht in den Zellkern der Tochterzelle inkorporiert werden. Chromatidfragmente ohne Centromer bewegen sich während der Zellteilung nicht zum Kern der Tochterzelle und verbleiben im Cytoplasma. Alle diese Partikel bilden Mikrokerne im Cytoplasma. Die Zellen werden über einen definierten Zeitraum (24 Stunden ohne S9-Mix; 4 Stunden mit S9-Mix) gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen einer Testsubstanz exponiert. Ein signifikant erhöhtes Auftreten von Zellen mit Mikrokernen im Vergleich zur Spontanrate in den Negativkontrollen zeigt an, dass die Testsubstanz Chromosomenbrüche oder Störungen des Spindelapparates auslösen kann. Aus der Häufigkeit des Auftretens von Mikrokernen wird die Mikrokernfrequenz errechnet. Steigt sie signifikant (χ^2 -Test) über die Frequenz der unbehandelten Negativkontrolle an, so ist von einem gentoxischen Effekt der Probe auszugehen.

Auswertung: Standardmäßig erfolgt die Auswertung mikroskopisch. Eine weniger zeit- und arbeitsaufwändige Alternative bietet die Auswertung mit einem Durchflusszytometer (Avlasevich et al. 2011).

Testorganismen: V79-Zellen (Fibroblasten des Chinesischen Hamsters) haben sich aufgrund der guten Zellkultivierung, schnellen Proliferation und hohen Sensitivität gegenüber Umweltchemikalien seit Jahr-

zehnten in *In-vitro*-Gentoxizitätstest mit dem Endpunkt Mikrokern-Induktion bewährt. Studien belegen jedoch auch im Vergleich zur untersuchten *In-vivo*-Gentoxizität eine erhöhte Rate an falsch-positiven Ergebnissen (Kirkland, 2007, 2008; Fowler, 2011). Als Ursache wird einerseits der fehlende humanbasierte Metabolismus gesehen, der zwar durch exogene metabolische Aktivierung in Form von Rattenleberhomogenat (S9-Mix) dem Zellsystem zugeführt wird, jedoch nur eingeschränkt den humanen Metabolismus abbilden kann. Andererseits müssen auch die eingeschränkte p53 Funktion, sowie veränderte DNA-Reparaturmechanismen berücksichtigt werden (Fowler, 2011). Im Einzelfall ist der Einsatz weiterer V79-Zelllinien mit modifiziertem Metabolismus bzw. von humanen Zellen (z.B. HepG2-Zellen (+ S9-Mix) oder HepaRG-Zellen) empfehlenswert.

Testprotokoll: Die Testdurchführung erfolgt nach dem Testprotokoll der ISO 21427-2. Ergänzender Hinweis: Da diesbezügliche Hinweise in der ISO 21427-2 fehlen, werden aufgrund der Erfahrungen im Tox-Box-Projekt folgende maximale Lösemittel-Konzentrationen in den Testansätzen empfohlen: max. 0,1 % DMSO; max. 0,8 % Ethanol.

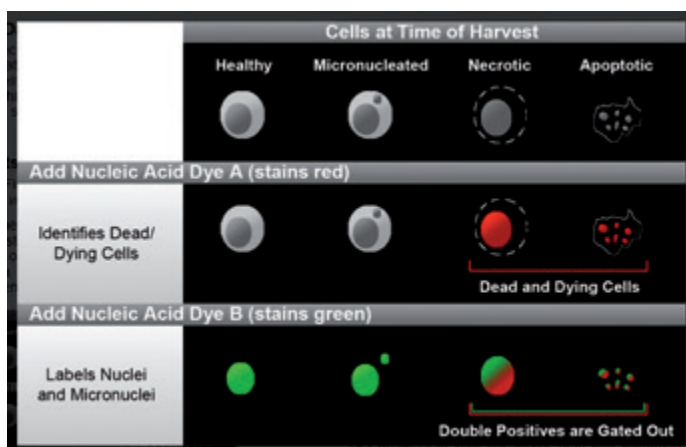


Abbildung 8: Prinzip des MicroFlow™-Messverfahrens (Quelle: www.LitronLabs.com)

Abweichend zu den Angaben der ISO 21427-2 kann der Test auch mittels Durchflusszytometrie ausgewertet werden.

Das Durchflusszytometer erlaubt im Gegensatz zur konventionellen mikroskopischen Auswertung einen sehr hohen Probendurchsatz und eine Kopplung mit dem Nachweis weiterer toxischer Wirkungen. Durch den Einsatz des Testkits „MicroFlow™“, Litron Laboratories Rochester, New York, können simultan in einem Ansatz neben den Mikrokernen die Parameter Vitalität, Apoptose/Nekrose und Zellproliferation bestimmt werden. Damit werden die sogenannten „Präkursor“-Ereignisse (z. B. Beeinflussung der Vitalität und Zellproliferation) mit erfasst und die Ergebnisse der Mikrokernbestimmung unter dem Aspekt der Induktion sekundärer Gentoxizität infolge zytotoxischer Wirkung, die zur Überbewertung der Befunde führen kann, validiert.

Das *In-vitro*-MicroFlow-Testkit wurde für die durchflusszytometrische Auszählung der Mikrokerne in Säugerzellkulturen entwickelt. Es ist ein effektives und schnelles Verfahren, bei dem eine Zweifarben-Markierungstechnik angewendet wird.

Ein Vorteil der *In-vitro*-MicroFlow-Methode gegenüber anderen automatischen Auswerteverfahren ist die Anwendung der sequentiellen Färbung. Diese ermöglicht, dass die Mikrokerne vom Chromatin der apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden können. Mit dieser Methode werden auch dann noch zuverlässige Mikrokern-Ergebnisse erhalten, wenn eine größere Anzahl toter Zellen vorhanden ist.

Eine Schlüsselkomponente im Kit ist der DNA-Farbstoff A (Ethidiummonoazid oder EMA). Die Substanz durchdringt die geschädigte äußere Membran der apoptotischen und nekrotischen Zellen. Eine besondere Ei-

genschaft dieses Farbstoffs ist auch, dass er durch Photoaktivierung kovalent an die DNA bindet. Nach diesem Schritt werden die Zellen gewaschen und die zytoplasmischen Membranen mit Detergentien aufgelöst, um den Zellkern und die Mikrokern freizusetzen.

Während des Lyseschritts wird der DNA-Farbstoff B (SYTOX Green) zugesetzt, er bindet an das gesamte Chromatin. Auf diese Weise wird eine unterschiedliche Färbung des gesunden Chromatins und des abgestorbenen Chromatins erreicht (Abbildung 8).

Literatur:

- Ashby J (1985) Fundamental structural alerts to potential carcinogenicity or noncarcinogenicity *Environmental and Molecular Mutagenesis* 7:919-921
- Avlasevich, S., Bryce, S., De Boeck, M., Elhajouji, A., Van Goethem, F., Lynch, A., Nicolette, J., Shi, J., Dertinger, S. (2011): Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: past, present and future. *Mutagenesis* 26(1): 147–152.
- Benigni, R. and Bossa, C. (2006): Structural Alerts of Mutagenes and Carcinogenes. *Current Computer-Aided Drug Design* 2(2): 189-176.
- Benigni, R., C. Bossa, C., Jeliaskova, N., Netzeva, T., Worth, A. (2008): The Benigni / Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity - a module of Toxtree (European Commission report EUR 23241)
- Clerch, B., Barbé, J., Llagostera, M. (1993): The role of the excision and errorprone repair systems in mutagenesis by fluorinated quinolones in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research* 281: 207-213.
- Ciaravino, V., Suto, M. J., Theiss, J. C. (1993): High capacity in vitro micronucleus assay for assessment of chromosome damage: results with quinolone/naphthyridone antibacterials. *Mutation Research* 298: 227-236.
- COM - The Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (2011): Guidance on a Strategy for genotoxicity testing of chemical substances.
- Corvi, R., Madia, F., Worth, A., Whelan, M. (2013): EURL ECVAM Strategy to Avoid and Reduce Animal Use in Genotoxicity Testing. JRC Scientific and Policy reports - European Union.
- DIN 38415-3 (1996): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 3: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test (T 3)
- DIN 38415-4 (1999): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 4: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials mit dem Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames Test) (T 4)
- Eastmond D.A., Hartwig A., Anderson D., Anwar W.A., Cimino M.C., Dobrev I., Douglas G.R., Nohmi T., Phillips D.H., Vickers C.(2009): Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis* 24(4): 341-349.
- Fowler, P., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Kirkland, D., Pfuhler, S., & Carmichael, P. (2012): Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 742(1): 11-25.
- Glatt, H.R., Gemperlein, I., Setiabudi, Platt, K.-L. Oesch, F. (1990): Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* 5(3): 241-249.
- ISO 11350 (2012): Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test).
- ISO 13829 (2000): Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test.
- ISO 16240 (2005): Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water - Salmonella/microsome test (Ames test).
- ISO 21427-2 (2009): Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Genotoxizität mit dem In-vitro-Mikrokern-test – Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten V79-Zellkulturlinie.

- Kazius, J., McGuire, R., Bursi, R. (2005): Derivation and Validation of Toxicophores for Mutagenicity Prediction. *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (1): 312-320.
- Kirkland, D., Pfuhrer, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Kasper, P., Kirchner S., Lynch A., Marzin D., Maurici D, Meunier JR, Müller L, Nohynek G, Parry J, Parry E, Thybaud V, Tice R, van Benthem J, Vanparys P, White P. (2007): How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary followup animal Tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 628(1): 31-55.
- Kirkland, D., Kasper, P., Müller, L., Corvi, R., & Speit, G. (2008). Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity Tests: a follow-up to an ECVAM workshop. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 653(1): 99-108.
- Kirkland D., Reeve L., Gatehouse D., Vanparys P. (2011): A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins; *Mutation Research* 721: 27-73.
- Kramer, M., Hübner, I., Schmidt, C.K. (2010): Zur Notwendigkeit des Kompetenzaufbaus im Bereich der Risikobewertung von organischen Kontaminanten bei Wasserversorgungsunternehmen – Erprobung und Etablierung von Genotoxizitätstests bei der RheinEnergie AG. In: Jahresbericht 2009 der Arbeitsgemeinschaft der Rhein-Wasserwerke e.V. (ARW), 66. Bericht: 93-112.
- Ku, W.W., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H.R., Gocke, E., Guzzie, P., Hakura, A., Honma, M., Martus, H.J., Scott Obach, R., and Roberts, S. (2007): Strategy for genotoxicity testing - metabolic considerations. *Mutation Research* 627: 59-77.
- Little J.W. & Mount D.W. (1982): The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29 (1): 11-22.
- Meinl, W., Hessel, S., Glatt, H.R. (manuscript in preparation): Heterologous expression of mammalian glutathione transferases in *Salmonella typhimurium* TA1535 and Chinese hamster V79 cells for the detection of genotoxicants.
- Miller EC, Miller JA (1981) Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules *Cancer* 47:2327-2345 doi:10.1002/1097-0142(19810515)47:10
- Oda Y, Nakamura S, Oki I, Kato T, Shinagawa H. (1985): Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res.* 147(5): 219-229.
- OECD Guideline 471 (1997): Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- OECD Guideline 487 (2016): In Vitro Micronucleus Test. OECD Guideline for the testing of chemicals.
- Prantl, E.M., Kramer, M., Schmidt, C., Knauer, M., Gartiser, S., Shuliakovich, A., Milas, J., Glatt, H.R., Meinl, W., Hollert, H. (2018): Comparison of in-vitro test systems using bacterial and mammalian cells for genotoxicity assessment within the "Health related indication value (HRIV)-concept". *Environmental Science and Pollution Research INT.* doi: 10.1007/s11356-016-8166-z. Volume 25, Issue 5, pp 3996–4010
- Rajagopalan M., Lu C., Woodgate R., O'Donnell M., Goodman M.F., Echols H. (1992): Activity of the purified mutagenesis proteins UmuC, UmuD', and RecA in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymerase III. *Proceedings of the National Academy of Science U S A.* 89 (22): 10777-81.
- Reifferscheid G. and Heil J. (1996): Validation of the SOS/umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Research.* 369(3-4): 129-45.
- Reifferscheid, G. and Buchinger, S. (2010): Cell-based genotoxicity testing: genetically modified and genetically engineered bacteria in environmental toxicology. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 118: 85-111.
- Reifferscheid, G., Maes, H., Allner, B., Badurova, J., Belkin, S., Blum, K., Brauer, F., Bressling, J., Domenenghetti, S., Elad, T., Flückigerlsler, S., Grummt, H.J., Guertler, R., Heringa, M., Hollert, H., Huber, S., Kramer, M., Magdeburg, A., Ratte, H.T., Sauerborn-Klobucar, R., Sokolowski, A., Soldan, P., Smital, T., Stalter, D., Venier, P., Ziemann, Chr., Zipperle, J., Buchinger, S. (2011): International round-robin study of the Ames fluctuation test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 53: 85-197.
- Tennant R.W., Margolin B.H., Shelby M.D., Zeiger E., Haseman J.K., Spalding J., Caspary W., Resnick M., Stasiewicz S., Anderson B. (1987): Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science* 236(4804): 933-941.
- Thier, R., Taylor, J. B., Pemble, S. E. Humphreys, W. G. Persmark, M. Ketterer B. and F. P. Guengerich (1993): Expression of mammalian glutathione S-transferase 5-5 in *Salmonella typhimurium* TA1535 leads to basepair mutations upon exposure to dihalomethanes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the SA* 90: 8576-8580.
- Zeiger E. (1987): Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Research* 47(5): 1287-96.

Modul Neurotoxizität 3

Tamara Grummt, Alexander Eckhardt, Rita Heinze, Ralf Junek, Thomas Braunbeck, Daniel Stengel

3.1 Definition des Wirkmechanismus und wissenschaftliche Grundlagen

Das menschliche Gehirn ist ein extrem komplexes Organ, vielleicht sogar die komplexeste Struktur im Körper überhaupt. Trotz intensiver Forschung besonders seit der Jahrtausendwende versteht man „nicht einmal in Ansätzen, nach welchen Regeln das Gehirn arbeitet“ (Weber 2014). Welche schweren persönlichen Veränderungen durch Störungen des Gehirns hervorgerufen werden können, zeigen zunehmend häufige Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson, aber auch weniger stark verbreitete Krankheitsbilder wie Schizophrenie oder Depression. Aufgrund ihrer Verbreitung stellen gerade die beiden erst genannten Erkrankungen nicht ausschließlich erhebliches Leid für die Betroffenen und ihre Angehörigen dar, sondern stellen die Gesellschaft als Ganzes vor eine große Herausforderung.

Bedingt durch die Komplexität des Nervensystems und einer zum Teil langen Latenzzeit zwischen Exposition und Wirkung muss auch bei der Untersuchung möglicher neurotoxischer Effekte versucht werden, Vorläuferereignisse („Präkursor“-Ereignisse) in Nervenzellen nachzuweisen. Oftmals ist eine Erfassung im Gesamtorganismus nicht möglich, da beispielsweise der Beobachtungszeitraum zu lang wäre oder die Ereignishäufigkeit im Falle von Tumorerkrankungen zu gering ist, um sie sicher erfassen zu können. Es wird daher auch bei der Untersuchung auf Neurotoxizität, ähnlich wie in der Untersuchung auf Gentoxizität, vermehrt dazu übergegangen, *In-vitro*-Testsysteme zur Bewertung von Substanzen heranzuziehen (Bal-Price et al. 2010). Andererseits kann aufgrund der Universalität neurotoxischer Prinzipien insbesondere im Screeningbereich zunehmend auf *In-vivo*-Modelle im Bereich niederer Wirbeltiere zurückgegriffen werden (de Esch et al. 2012, Lee & Freeman 2014, Ton et al. 2006).

Neurotoxische Wirkungen können sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Manche Effekte treten unabhän-

gig vom Alter der betroffenen Person auf, während andere u.U. nur in einer bestimmten Entwicklungsphase oder bei chronischer Exposition auftreten. Die akut toxische Wirkung von Pestiziden aus der Gruppe der Organophosphate auf die Acetylcholinesterase ist beispielsweise altersunabhängig. Traurige Berühmtheit erlangten die Kampfgase Sarin und Tabun, die ebenfalls zur Gruppe der Organophosphate zählen.

Zwei weitere bekannte Neurotoxine zeigen dagegen eine stark alters- bzw. entwicklungsabhängige Toxizität: Ethanol und Blei. Während gelegentlicher, maßvoller Alkoholenuss für einen gesunden Erwachsenen kein Problem darstellt, kann schon der einmalige Alkoholkonsum einer Schwangeren zu massiven Entwicklungsstörungen beim Fetus führen, insbesondere im ersten Drittel der Schwangerschaft. Aber auch genetische Aspekte spielen bei Erwachsenen eine Rolle: So ist die Metabolisierung von Alkohol durch die Alkoholdehydrogenase genetisch determiniert.

Die im Vergleich zu Erwachsenen erhöhte Empfindlichkeit von Säuglingen und Kleinkindern gegenüber einer Bleiexposition war die Ursache für die stufenweise Senkung des Bleigrenzwertes im Trinkwasser von 40 µg/L auf 10 µg/L in den Jahren 2003 bis 2013. Im Hinblick auf Blei sind Kinder in doppelter Hinsicht stärker gefährdet als Erwachsene: Zum einen resorbieren sie rund 50 % des aufgenommenen Bleis über den Verdauungstrakt, während Erwachsene nur etwa 5 % resorbieren. Zum anderen ist das Nervensystem von Kindern noch nicht vollständig ausgebildet, und die Entwicklung des Nervensystems wird durch Blei stark beeinträchtigt. Durch die erhöhte Resorptionsrate kommt es zu höheren Bleispiegeln im Blut von Kindern. Dies kann zu Entwicklungsstörungen wie Hyperaktivität, Störungen der Feinmotorik bis hin zur Minderung der intellektuellen Fähigkeiten führen (He et al., 2017).

Im Sinne des Ressourcenschutzes wird auch die Ökotoxikologie betrachtet. Hier beschränkt sich ein Großteil der bisher bekannt gewordenen Studien auf die

Wirkungen auf Fische, wobei die meisten der oben für Säugetiere beschriebenen neurotoxischen Effekte auch bei Fischen beobachtet werden können (de Esch et al. 2012, Lee & Freeman 2014, Ton et al. 2006). Da jedoch das Schutzziel der Ökotoxikologie generell nicht das Individuum, sondern das Wohlergehen der Population ist, werden neurotoxische Effekte bei Fischen vor allem vor dem Hintergrund von Verhaltensveränderungen betrachtet (Selderslaghs et al. 2013, Tierney 2011). Diese können nicht nur in der Interaktion mit potenziellen Feinden und Beutetieren Nachteile mit sich bringen, sondern letztendlich auch direkt zu einem geringeren Reproduktionserfolg führen. Insbesondere mit Larven von Fischen wurden in den letzten Jahren umfangreiche Screeningprogramme auf neurotoxisch wirksame Substanzen aufgelegt, die bei der Identifikation von neurotoxischen Substanzen in den meisten Fällen eine hervorragende Korrelation zwischen Befunden am Fisch und am Säugetier erbracht haben.

Als weitere Besonderheit existiert mit dem Seitenliniensystem beim Fisch ein Sinnessystem, das es in dieser Form bei landlebenden Wirbeltieren (also auch Säugetieren) nicht gibt; allerdings ergeben sich starke Parallelen zum Innenohr aller anderer Wirbeltiere, da das Seitenlinienorgan zum einen von einem Seitenast des Nervus statoacusticus innerviert wird und zum anderen die Sinneszellen im Seitenliniensystem (Neuromasten) in ihrem Aufbau mit den Haarzellen im Innenohr identisch sind. Eine Besonderheit ergibt sich beim Fisch jedoch aus der Tatsache, dass die Neuromasten im Gegensatz zu den Haarzellen des Innenohrs direkt über die lateralen Öffnungen des Seitenliniensystems mit Umweltschadstoffen in Berührung kommen können (Stengel et al. 2017).

Alternativmethoden für klassische Tests auf Neurotoxizität

Für die Untersuchung von neurotoxischen Effekten, auch im Hinblick auf die Entwicklungstoxikologie,

gibt es seit längerem Bestrebungen, Alternativen zu Tierversuchen zu finden. Bei Anwendung der derzeit gültigen Richtlinie zur Ermittlung von Entwicklungsneurotoxizität (OECD 2007, U.S. EPA 1996) einer einzigen Substanz müssen mehr als 1000 weibliche Tiere getötet werden (Price et al. 1996). Es ist deshalb erforderlich, eine verlässliche Batterie von Screening-Verfahren zu etablieren, auf deren Grundlage dann weitere spezifische Tests durchgeführt werden, wenn eine Substanz toxische Potenziale aufweist (Crofton et al. 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass neurotoxische Wirkungen nicht nur auf die Nervenzellen selbst, sondern auch auf die Übertragung von Impulsen durch die Nervenzellen wirken können, ist es derzeit noch erforderlich, für bestimmte Fragestellungen Untersuchungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchzuführen (Kais et al. 2015, Stengel et al. 2017). Allerdings kann im Falle der Fische bereits auf Embryonen zurückgegriffen werden (vgl. unten).

Ein ganz anderer Ansatz zur Etablierung von Alternativmethoden könnte darin bestehen, dass die mittlerweile in mehreren Labors entwickelten verhaltensbasierten Neurotoxizitätsscreens mit Fischlarven im Sinne eines Vorscreenings den *In-vivo*-Experimenten mit Säugetieren vorangeschaltet werden (Tierney 2011). Dies entspricht in zweierlei Hinsicht den Vorgaben z.B. des deutschen Tierschutzgesetzes: Zum einen fordert das Gesetz, entsprechende Versuche immer mit dem am geringsten entwickelten Organismus durchzuführen – und hier steht der Fisch eindeutig unter dem Säugetier. Andererseits werden Embryonen von Fischen bis zum Beginn der exogenen Nahrungsaufnahme nach den Vorgaben der derzeit gültigen EU-Tierschutzrichtlinie (EU 2010) nicht als schützenswert eingestuft, so dass z.B. Experimente mit bis zu 120 h alten Larven des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) in zahlreichen Staaten Europas nicht als Versuche mit geschützten Lebensstadien eingestuft und genehmigt werden müssen (Strähle et al. 2012). Nicht

zuletzt aus diesem Grunde wurde auch der Fischembryotest mit dem Zebrafisch als OECD-Verfahren genormt (OECD 2013) und stellt damit das erste international genormte Alternativverfahren zu einem klassischen Toxizitätstest mit Fischen dar (Braunbeck et al. 2015; Strähle et al. 2012).

Der gerade im Bereich der Medikamentenentwicklung weit verbreitete Ansatz, Substanzen in silico, also durch Computermodelle zu testen, konnte sich in der Neurotoxikologie bisher nicht durchsetzen. Zwar gab es bereits Mitte der 1990er Jahre einen ersten Ansatz von Cronin durch so genannte Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (quantitative structure-activity relationship, QSAR), von der Struktur einer Substanz, hier organische Lösungsmittel, auf deren neurotoxisches Potenzial zu schließen, doch die Erfolge waren gering (Cronin 1996). Weitere Untersuchungen von Yazal et al. und Makhaeva et al. beschränkten sich

auf Serinesteraseinhibitoren und lassen keine Verallgemeinerungen zu (El Yazal et al. 2001; Makhaeva et al. 2012). Dies macht deutlich, dass Untersuchungen zur Neurotoxizität nach wie vor von lebenden Zellen und Organismen abhängig sind.

3.2 Stand der Regulation

Eine Bewertung des neurotoxischen Potenzials ist zwar auf Basis des in der Einleitung erläuterten GOW Konzeptes möglich, doch hat diese Methodik ihre Grenzen. Wie aus der Arbeit von Kroes et al. (2000) zu ersehen ist, umfassen die NOELs (No Observed Effect Level) von trinkwasserrelevanten Substanzen, deren empfindlichster Endpunkt Neurotoxizität ist, einen Konzentrationsbereich von mindestens 3 Zehnerpotenzen. Das GOW-Konzept deckt zuverlässig auch die stärksten trinkwasserrelevanten Neurotoxine ab. Daher erlaubt die genaue Bewertung des neu-

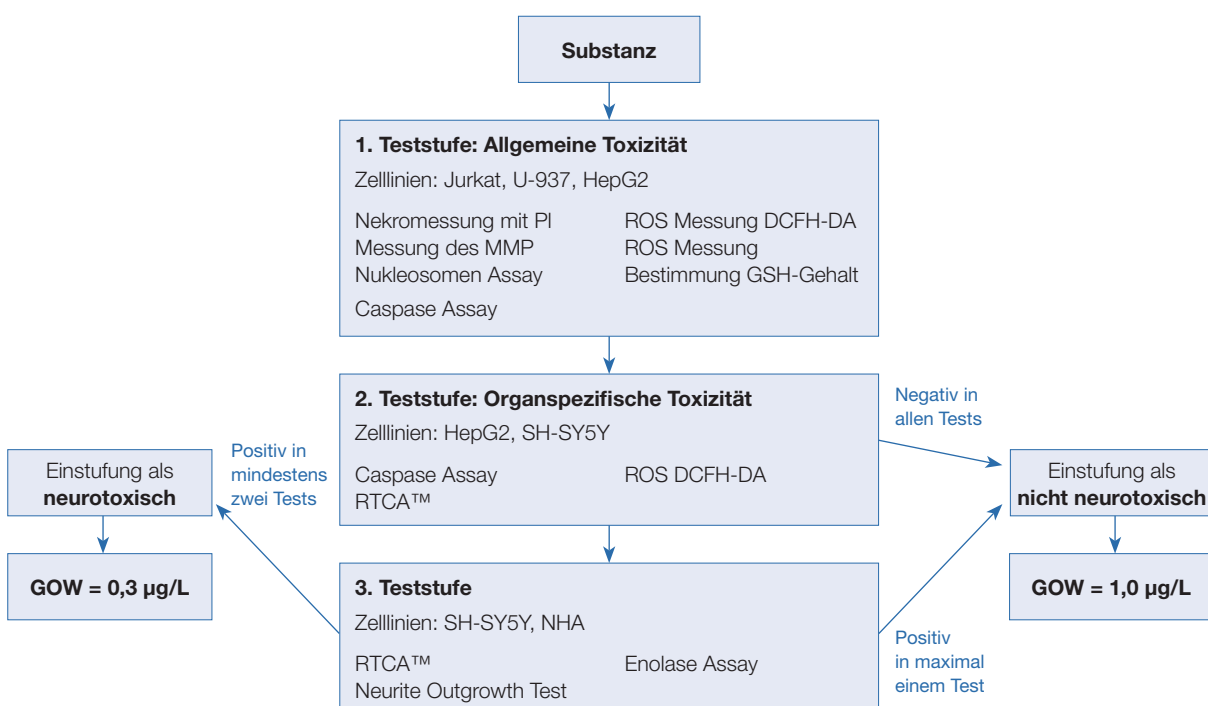


Abbildung 9: Schema zur *In-vitro*-Testung auf mögliche Neurotoxizität

rotoxischen Potenzials unter Umständen kurzzeitige Überschreitungen des GOW von 0,3 µg/L für neurotoxische Substanzen im Trinkwasser.

3.3 Teststrategie zur Bewertung von Neurotoxizität

Die *In-vitro*-Prüfung auf Neurotoxizität erfolgt mit Hilfe eines dreistufigen Bewertungssystems (Abbildung 9). Ein entscheidender Schritt ist dabei, Neurotoxizität von zytotoxischen Effekten zu unterscheiden. In der ersten Teststufe werden Untersuchungen zur Zytotoxizität durchgeführt. Dies dient auch der Festlegung der Testkonzentrationen für die nachfolgenden spezifischen Untersuchungen zur Neurotoxizität. Das vorliegende Konzept ist ein erster innovativer Schritt zur Bewertung von Neurotoxizität und wird im Anschlussprojekt „Neuro-Box“ (BMBF Förderkennzeichen: 02WRS1419) validiert und gegebenenfalls modifiziert.

Für eine schnelle Bewertung in der Neurotoxikologie sind Untersuchungen an Zellkulturen eine wichtige Basis. So gibt beispielsweise der Vergleich zwischen den Effekten einer Chemikalie auf eine Leberzelllinie mit den Effekten auf eine Nervenzelllinie einen ersten Hinweis auf ein mögliches spezifisch neurotoxisches Potenzial. Etablierte Zelllinien sind in diesem Zusammenhang SH-SY5Y Neuroblastomzellen sowie die humane differenzierungsfähige Ntera 2 Zelllinie (Stern et al. 2014). Für die Neurotoxizitätstestung im Rahmen dieses Leitfadens werden für die Screeningtests SH-SY5Y Zellen sowie als Vergleichszellen HepG2 Zellen verwendet. Der Einsatz von SH-SY5Y Zellen erspart im Vergleich zu Ntera 2 Zellen die langwierige Differenzierungsphase, was eine schnellere Bewertung ermöglicht. Da beide Zelllinien humanen Ursprungs sind, sind sie metabolisch näher am Menschen als z. B. Maus- oder Rattenzelllinien. Die Tatsache, dass primäre Zellen metabolisch kompetenter und dem Ursprungsorgan besser entsprechen, erscheint für ein erstes Screening weniger relevant. Sobald jedoch der Verdacht auf Neurotoxizität besteht, müssen weiterführende spezifische Testver-

fahren zum Einsatz gebracht werden. Hierfür werden primäre humane Astrozyten (NHA, Normal Human Astrocytes) benutzt. Es handelt sich dabei nicht um eine immortalisierte Zelllinie, sondern um Primärzellen, die aber kommerziell verfügbar sind.

Mit *In-vitro*-Verfahren kann u. a. der Einfluss einer Substanz auf die Proliferation von Zellen nachgewiesen werden. Dies geschieht mit Hilfe des „Real Time Cell Analyzers“ (RTCA™, OLS, Bremen). Dazu werden Zellen in einer speziellen Zellkulturplatte ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz belastet. Unbelastete Zellen dienen als Negativkontrolle, eine Positivkontrolle in Form eines bekannten Toxins als Effektkontrolle. Die Zellkulturplatten, so genannte Eplates, verfügen über Goldkontakte mit denen die Impedanz der Zellen gemessen werden kann. Mit steigender Zellzahl und Zellausbreitung steigt die Impedanz an und ist somit ein Maß für die Proliferation. Reduziert die betreffende Substanz die Proliferation und damit die Impedanz im Vergleich zur Negativkontrolle, kann von einem toxischen Effekt ausgegangen werden. Für die Ermittlung des neurotoxischen Potenzials wird die Wirkung auf Nervenzellen mit der Wirkung auf Leberzellen verglichen. Im konkreten Fall werden Neuroblastomzellen (SH-SY5Y Zellen) mit Hepatokarzinomzellen (HepG2 Zellen) verglichen. Eine stärkere Wirkung auf Neuroblastomzellen deutet auf neuro-toxische Effekte hin.

Neben der Proliferation werden auch die Induktion von Apoptose und Nekrose vergleichend untersucht. Beim Zugrundegehen einer Zelle kann es zu Apoptose oder Nekrose kommen. Unter Apoptose versteht man den geordneten Zelltod, unter Nekrose den ungeordneten. Obwohl für die einzelne Zelle das Ergebnis letztlich gleich ist, spielt diese Unterscheidung für den Gesamtorganismus eine wichtige Rolle. Während bei der Apoptose die Zellbestandteile soweit wie möglich vom Gesamtorganismus geregelt aufgenommen und wiederverwertet werden, kommt es bei der Nekrose zum unkontrollierten Zerplatzen der Zelle. Da bei dem

letztenannten Vorgang beispielsweise auch der Inhalt der Lysosomen freigesetzt wird, kommt es häufig zu Entzündungsreaktionen, die das umliegende Gewebe beeinträchtigen können. Aufgrund dieser Effekte ist eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Effekten für die Einschätzung des toxischen Potenzials einer Substanz erforderlich.

Des Weiteren wird in der vorgestellten Testbatterie für Neurotoxizität die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) untersucht. Reaktive Sauerstoffspezies gelten nicht nur bei der Entstehung von Krebs, sondern auch bei Entwicklung neurotoxischer Störungen als Auslöser von Vorläuferereignissen. Das Gehirn ist gegenüber ROS besonders anfällig, weil es einen sehr hohen Sauerstoffbedarf hat. Zudem verfügt das Gehirn einerseits über relativ wenige endogene Antioxidantien wie Glutathion oder Vitamin C und andererseits sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Nervenzellen leicht oxidierbar (Barnham et al. 2004; Mates 2000). Man geht heute davon aus, dass ROS sowohl bei der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten, z. B. Alzheimer oder Parkinson-Krankheit, als auch bei neuronalen Entwicklungsstörungen wie Autismus und Schizophrenie eine entscheidende Rolle spielen (Barnham et al. 2004)

Der hierarchische Aufbau der Testbatterie bedingt, dass die spezifischen Tests zur Neurotoxizität erst bei einem begründeten Verdacht auf Neurotoxizität durchgeführt werden. Die spezifischen Tests im Rahmen der Neurotoxizitätsprüfung bestehen aus (1) der Proliferationsmessung von NHA Zellen mittels RTCA™, (2) dem Neurite Outgrowth-Assay mit SH SY5Y Zellen und (3) dem Neuriten-spezifischen Enolase-Assay. Die Proliferationsmessung mit primären NHA Zellen dient der Absicherung der mit SH SY5Y erzielten Ergebnisse. Mit dem Neurite Outgrowth-Assay wird überprüft, ob die Belastung mit der zu untersuchenden Substanz zur Bildung von Neuriten führt. Dieser Test kann mit unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt werden (Kim et al. 2007). In diesem Leitfaden wird aber ausschließlich die Verwendung von SH-SY5Y Zellen beschrieben, da es

sich hierbei um humane Zellen handelt und somit eine höhere Humanrelevanz besteht. Die von den Zellen gebildeten Neuriten können durch Fluoreszenzmessungen bestimmt werden. Dabei werden die unterschiedlichen Flächen der Zellen in den verschiedenen Ansätzen miteinander verglichen. Je größer die Flächen sind, desto mehr Neuriten wurden gebildet bzw. desto länger sind die Neuriten. Eine Reduktion des Neuritenwachstums stellt einen weiteren neurotoxischen Effekt dar.

Die Freisetzung des Enzyms Neuriten-Spezifische Enolase (NSE) in das extrazelluläre Lumen ist seit Mitte der 1980er Jahre bekannt und spielt auch heute eine Rolle bei der Bewertung der Schwere von Schlaganfällen und als Tumormarker (Al-Rawi and Atiyah 2009; Dufour et al. 2006; Steinberg et al. 1984). Übertragen auf die Zellenkultur bedeutet das, dass die Nervenzellen vermehrt Enolase in das Medium freisetzen. Dies beruht auf einer Schädigung der Membranintegrität. Die Freisetzung der Enolase wird mittels ELISA im Fluoreszenzphotometer gemessen. Je mehr Enolase freigesetzt wird, desto größer ist die schädigende Wirkung.

Im Bereich der *In-vivo*-Untersuchungen zur Neurotoxizität beschränkt sich der vorliegende Leitfaden ausschließlich auf Untersuchungen, die an Embryonen von Fischen durchgeführt werden können, also einem Entwicklungsstadium, das in der EU nicht als geschützt im Sinne des Tierschutzes gilt. Neben der klassischen Messung der Acetylcholinesterase als einem Marker für Störungen in der Transmission von Nervenimpulsen hat sich insbesondere der Nachweis von Effekten auf die Neuromasten im Seitenliniensystem als ein besonders empfindlicher Test erwiesen; die Neuromasten gelten als Modell für die Sinneszellen im Innenohr der Wirbeltiere, also für ein Sinnesorgan von zentraler Bedeutung.

Sollte eine Substanz mit Hilfe der *In-vivo*-Untersuchungen als neurotoxisch einzustufen sein, resultiert dies in einem GOW-Wert von 0,3 µg/L; sollte sich eine Substanz als nicht neurotoxisch erweisen, folgt ein GOW-Wert von 1,0 µg/L (vgl. Abbildung 9).

3.4 Testprotokolle der einzelnen Testverfahren und Ergebnisbewertung

In-vitro-Untersuchungen zur Neurotoxizität

Die Protokolle für die Durchführungen der einzelnen Untersuchungen können von den verantwortlichen Laboren (s. Punkt 8.) bezogen werden. In den jeweiligen Protokollen sind auch die notwendigen Gerät-

schaften aufgeführt. Die Nennung von Firmen und Geräten stellt keine Werbung dar, sondern beruht ausschließlich auf der Ausstattung der ausführenden Labore. Alle anderen Geräte, die die notwendigen Wellenlängen messen können, sind für die Durchführung der Untersuchungen geeignet. Gleiches gilt für den Gebrauch von Chemikalien, Testkits, etc..

Zellkultur

Tabelle 1: Zelllinien, die für die entsprechenden Untersuchungen benötigt werden:

Zelllinie	Organ	Nachweisverfahren	Herkunft	Protokoll zur Kultivierung
Jurkat - Suspensionszellen	Blut T-Lymphozyten T-Zell-Leukämie	Nekrose (PI) ROS (DHE) Apoptose (MMP, TMRE)	Leibniz-Institut, DSMZ, Braunschweig, ACC-282	Protokoll 1
U-937 - Suspensionszellen	Blut Monozyten Histiozytäres Lymphom	Apoptose (CDD ⁺ -ELISA, Caspasen)	Leibniz-Institut, DSMZ, Braunschweig ACC-5	Protokoll 2
HepG2 - adhärenente Zellen	Leber Hepatozelluläres Karzinom	RTCA™ ROS (DCFH-DA) Apoptose (MMP, TMRE)	Leibniz-Institut, DSMZ, Braunschweig ACC-180	Protokoll 3
SH-SY5Y - adhärenente Zellen	Nervensystem Neuroblastom Subclon der SK-N-SH Zelllinie	RTCA™ ROS (DCFH-DA) Apoptose (CDD ⁺ -ELISA, Caspasen) Neurite Outgrowth Assay NeuronSpecific Enolase p38 MAP Kinasen	Leibniz-Institut, DSMZ, Braunschweig ACC-209	Protokoll 4
Primärzellen	Organ	Nachweisverfahren	Herkunft	Protokoll zur Kultivierung
Clonetics™ Normal Human Astrocytes (NHA) - adhärenente Zellen	Nervensystem Astrozyten	RTCA™	Lonza CC-2565	Protokoll 5

1. *In-vitro*-Teststufe: Allgemeine Toxizität (Zytotoxizität)

In dieser Teststufe wird als erstes zwischen möglicher Apoptose und Nekrose unterschieden, dabei werden Zellkulturen verwandt, die nicht aus dem Nervensystem stammen. Die Untersuchungen werden bis zu einer Konzentration von 1 g/L bzw. dem Erreichen der Löslichkeitsgrenze durchgeführt. Bei Stoffen, die bis zu einer Konzentration von 1 g/L nicht zytotoxisch sind, geht man davon aus, dass deren eventuelle Zytotoxizität in höheren Konzentrationen nicht für die Betrachtung im Trinkwasser relevant ist, da ein Auftreten in diesen Konzentrationen als äußerst unwahrscheinlich anzusehen ist. Für die Verfahren sind testspezifische Zelllinien erforderlich.

Der Nachweis von Nekrose erfolgt im Durchflusszytometer mittels Propidiumiodid (PI). Der Zytotoxizitätstest mittels PI zum Nachweis von nekrotischen Zellen basiert auf dem Unvermögen dieses Fluoreszenzfarbstoffes, die intakte Zellmembran vitaler Zellen zu durchdringen. In nekrotische Zellen mit geschädigter Zellmembran kann der Farbstoff eindringen und im Zellkern mit der DNA interkalieren (**Protokoll 101**).

Im Gegensatz zur Nekrose ist der apoptotische Zelltod durch den programmatischen Ablauf von komplexen Prozessen gekennzeichnet. Die Anwendung mehrerer Testverfahren, die auf die einzelnen Apoptoseschritte ausgerichtet sind, ist daher erforderlich. Ein Indikator für Apoptose ist das Mitochondrienmembranpotenzial (MMP). In intakten Zellen sammelt sich der kationische Farbstoff Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) in der Membran der Mitochondrien. Daher können die Zellen mit intaktem MMP durch ihre intensive Rotfluoreszenz von den Zellen mit gestörtem MMP durch die Abnahme der Fluoreszenz bei Messung mit dem Durchflusszytometer unterschieden werden (**Protokoll 102**). Als zweites Testverfahren zum Nachweis apoptotischer Wirkungen wird die DNA Spaltung in Nukleosomen mittels CDD⁺-ELISA untersucht (**Protokoll 103**). Nukleosomen als charakteristische Fragmente der ge-

nomischen DNA sind DNA-Histon Komplexe. Je stärker die DNA aufgespalten ist, desto intensiver erfolgt die Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff und desto weiter ist die Apoptose somit fortgeschritten. Im Verlauf der apoptotischen Prozesse in den Zellen erfolgt die Aktivierung einer Kaskade von Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden. Der Aktivitätsnachweis dieser Caspasen ist ein biochemischer Nachweis der Apoptose (**Protokoll 104**). Eine starke Caspaseaktivität ist ein Indiz für Apoptose im späten Stadium.

Neben Nekrose und Apoptose sind auch Störungen im Redox-Gleichgewicht der Zelle ein Hinweis auf mögliche toxische Effekte. Hierbei spielt sowohl die Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) als auch der Verbrauch von zelleigenen Antioxidantien wie Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle. Da es sich bei den ROS um eine Gruppe von Stoffen handelt, werden diese mit zwei Methoden nachgewiesen: einmal mit dem Farbstoff DCFH-DA (**Protokoll 105**) und einmal mit DHE (**Protokoll 106**). Auf diese Weise kann ein breiteres Spektrum von ROS erfasst werden. Das Tripeptid Glutathion (GSH) dient der Neutralisierung von ROS. Es ist intrazellulär in hohen Konzentrationen vorhanden. Messbare Veränderungen des GSH-Gehaltes sind somit ebenfalls ein wichtiger Indikator für Störungen des Redox-Gleichgewichts. Die Fluoreszenz des Farbstoffes Monochlorbimanin in der Zelle ist proportional zum GSH-Gehalt (**Protokoll 107**).

In der Auswertung der Untersuchungen werden die jeweiligen EC₁₀- und EC₅₀-Werte ermittelt; diese dienen als Ausgangskonzentrationen für die weiteren Untersuchungen. Da in der ersten Teststufe keine Nervenzellen untersucht werden, ist es auch dann erforderlich, die zweite Teststufe durchzuführen, wenn keine toxischen Effekte in der ersten Stufe gefunden wurden, weil es nicht auszuschließen ist, dass sich die Toxizität auf Nervenzellen beschränkt.

2. *In-vitro*-Teststufe: Organspezifische Toxizität

Die zweite Teststufe ist so ausgerichtet, dass die Spezifität in Bezug auf Neurotoxizität zunimmt. Da es sich bei der in der ersten Teststufe nachgewiesenen Toxizität nicht um Neurotoxizität handeln muss, werden in der zweiten Teststufe vergleichende Untersuchungen zwischen Leberzellen (Hepatokarzinomzelllinie HepG2) und Nervenzellen (Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y) durchgeführt. Wie in der ersten Teststufe werden die Bildung von ROS und die Induktion von Apoptose untersucht. Zusätzlich werden Änderungen der Zellmorphologie und des Zellwachstums mit dem Real Time Cell Analyzer (RTCA™) ermittelt.

Der Nachweis der Bildung von ROS erfolgt in dieser Teststufe mit DCFH-DA (**Protokoll 105**), der Nachweis von Apoptose über die Messung der Caspaseaktivität (**Protokoll 104**). Im RTCA™ wird durch Messung der Impedanz nachgewiesen, ob sich die Morphologie der Zellen und/oder ihre Anzahl verändert (**Protokoll 108**). Eine Reduktion der Impedanz in der jeweiligen Kavität der speziellen Multiwell-Platte ist ein Hinweis auf das Absterben oder Ablösen der adhärennten Zellen vom Boden des Gefäßes.

Wenn sich bei der Auswertung zeigt, dass die Nervenzellen in einem oder mehreren Testsystemen empfindlicher reagieren als die Leberzellen, wird dies als Hinweis auf eine mögliche Neurotoxizität gewertet, und es folgen Untersuchungen der dritten Teststufe. Ist dies nicht der Fall, werden derzeit keine weiteren Tests durchgeführt und davon ausgegangen, dass von dieser Substanz kein neurotoxisches Gefährdungspotenzial aufweist.

3. *In-vitro*-Teststufe: Weiterführende Untersuchung der Neurotoxizität

Die dritte Stufe hat zum Ziel, ein neurotoxisches Potenzial in Bezug zum GOW-Konzept zu bewerten. Wie in Stufe 2 wird auch in der dritten Teststufe das RTCA™ zur Erfassung möglicher Beeinflussungen von Zellzahl und -morphologie durch die zu unter-

suchende Substanz eingesetzt. Für eine verbesserte Spezifität werden jedoch in der dritten Stufe primäre humane Astrozyten eingesetzt, da diese sensibler als Neuroblastomzellen auf toxische Chemikalien reagieren (**Protokoll 108**).

Ein weiterer Bestandteil der dritten Teststufe ist die Bestimmung der Neuriten Spezifischen Enolase (NSE, **Protokoll 109**). Enolasen sind Enzyme des Glukosestoffwechsels, die γ -Enolase ist dabei spezifisch für Nervenzellen. Ein Anstieg der Konzentration von NSE im Zellkulturüberstand und intrazellulär ist ein Hinweis auf Störungen im Zellstoffwechsel.

Der dritte Teil der dritten Teststufe ist der Nachweis der Neuritendifferenzierung durch den sogenannten Neurite Outgrowth-Assay. Dabei wird untersucht, ob die Belastung von SH SY5Y Zellen mit der zu untersuchenden Substanz zu einer Differenzierung der Zellen und damit zur Ausbildung von Neuriten führt (**Protokoll 110**). Das Maß der Veränderung des Differenzierungsgrads ist ein Indikator für das neurotoxische Gefährdungspotenzial der Substanz.

Wenn die zu untersuchende Substanz in der zweiten Teststufe keine Hinweise auf Neurotoxizität gibt, wird sie derzeit als nicht neurotoxisch eingestuft und die Durchführung der dritten Teststufe entfällt. Zeigt sich in der zweiten Teststufe dagegen mindestens ein Hinweis auf Neurotoxizität, wird die dritte Teststufe durchgeführt. Liefern dabei mindestens zwei Assays neurotoxische Effekte, wird die Substanz als neurotoxisch eingestuft. Um ein möglichst belastbares Ergebnis zu erhalten, müssen alle drei Untersuchungen der dritten Teststufe durchgeführt werden.

Gemäß des GOW-Konzeptes ergibt sich für einen Stoff, der als neurotoxisch eingestuft wird, ein GOW von 0,3 $\mu\text{g/L}$.

***In-vivo*-Untersuchungen im Modul Neurotoxizität**

Der *In vivo*-Teil der Untersuchungen zur Neurotoxizität erfolgt an Embryonen des Zebraäbrlings (*Danio rerio*), die nach der EU-Richtlinie 2010/63/EU nicht als geschützte Lebensstadien im Sinne des Tierschutzes eingestuft werden (Braunbeck et al. 2015; EU 2010; Strähle et al. 2012). Die Zebraäbrlingsembryonen werden für die Testes nach den Vorgaben der OECD Richtlinie (OECD 2013; **Protokoll 111**) exponiert und danach auf Veränderungen der beiden folgenden Endpunkte untersucht:

- (1) Veränderung der Acetylcholinesterase-Aktivität an cholinergen Synapsen (**Protokoll 112**) und
- (2) Veränderungen an den Neuromasten im Seitenliniensystem der Fische (**Protokoll 113**).

Des Weiteren wurden substanzinduzierte Veränderungen in Riechepithelien und Netzhaut untersucht (Ab-

bildung 10). Jedoch erwiesen sich Effekte in diesen Sinnesorganen im subletalen Bereich der EC_{10} -Werte als nicht empfindlich genug für den Nachweis einer Schädigung.

Grundstufe der *In-vivo*-Prüfung auf Neurotoxizität: Fischembryotest

Wie bei den *In-vitro*-Testes zum Nachweis neurotoxischer Wirkungen (s.o.) ist es von ausschlaggebender Bedeutung, dass primär neurotoxische Effekte von Veränderungen getrennt werden, die sich im Zuge allgemeiner Toxizität als Sekundäreffekte ergeben. Zu diesem Zweck werden aus dem Fischembryotest nach OECD TG 236 (**Protokoll 111**) die EC_{10} -Werte für sowohl akut toxische als auch subletale Effekte (vgl. Tabelle 2) ermittelt. Die EC_{10} -Werte sind die Maximalkonzentrationen, die in den nachfolgenden Neurotoxizitätstests geprüft werden.

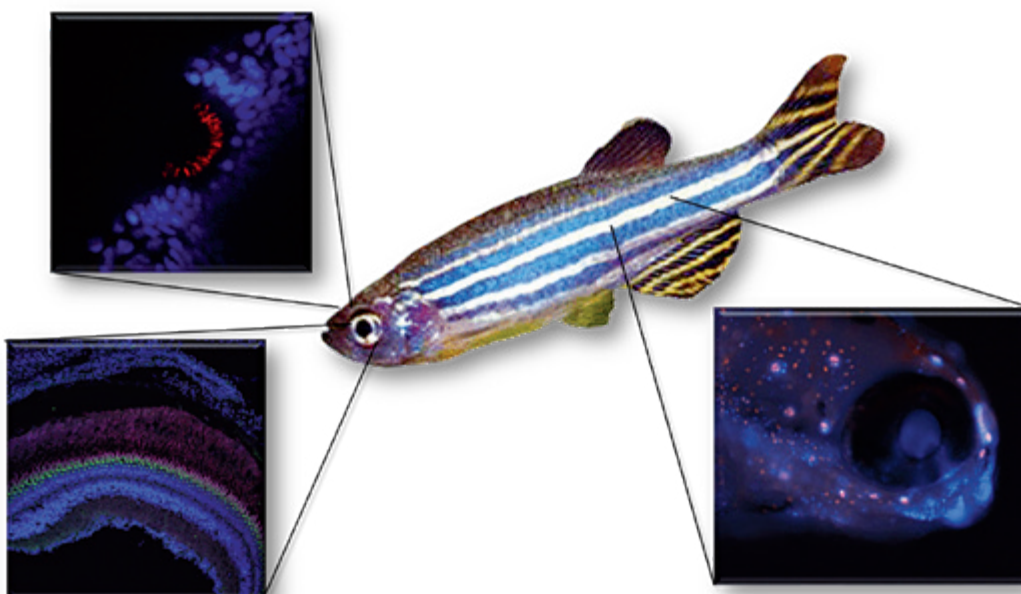


Abbildung 10: Nachweis spezifischer neurotoxischer Effekte im Riechepithel (oben links), in der Retina (unten links) und im Seitenliniensystem (Neuromasten-Assay) im Zebraäbrling (*Danio rerio*; Stengel et al. 2017).

Tabelle 2: Toxikologische Endpunkte für akute und subletale Veränderungen im Fischembryo-otest mit dem Zebraabrling (*Danio rerio*) nach OECD TG 236 (Zusammenstellung nach Ensenbach 1998, Nagel 2002 sowie Braunbeck et al. 2015).

Toxikologische Endpunkte		24 h	48 h	72 h	96 h
Akute Toxizität (OECD TG 236)	Koagulation der Embryonen	◆	◆	◆	◆
	Fehlende Somitenbildung	◆	◆	◆	◆
	Nichtablösung der Schwanzknospe	◆	◆	◆	◆
	Fehlender Herzschlag		◆	◆	◆
Subletale Endpunkte (Teratogenität)	Fehlende Blutzirkulation		○	○	○
	Abnahme der Blutzirkulation		○	○	○
	Missbildungen der Herzens		○	○	○
	Missbildungen des Kopfes		○	○	○
	Missbildung/Fehlen der Augen	○	○	○	○
	Missbildung der Sacculi/Otolithen	○	○	○	○
	Missbildungen der Somiten	○	○	○	○
	Missbildungen des Schwanzes	○	○	○	○
	Verkürzung des Schwanzes	○	○	○	○
	Wirbelsäulenmissbildungen (Skoliose, Lordose)	○	○	○	○
	Allgemeine Entwicklungsverzögerung	○	○	○	○
	Bildung von Ödemen	○	○	○	○
	Veränderungen/Fehlen der Pigmentierung		○	○	○
	Deformation des Dottersacks	○	○	○	○
	Fehlende Spontanbewegungen	○	○	○	◆

- ◆ Letale Kriterien zur Bestimmung der akuten Toxizität (LC-Werte)
- Subletale Veränderungen zur Bestimmung von EC-Werte

In-vivo-Nachweis spezifischer neurotoxischer Wirkungen I: Acetylcholinesterasetest

Die Hemmung der Acetylcholinesterase nach Belastung mit Insektiziden aus der Klasse der Phosphorsäureester und der Carbamate ist ein klassischer En-

zym-Assay auf neurotoxische Wirkung bei tierischen Organismen, der für die Embryonen des Zebraabrlings optimiert wurde (Kais et al. 2015; Küster and Altenburger 2006); **Protokoll 112**. Als höchste Testkonzentration wird der aus dem Fischembryotest ermittelte EC10-Wert eingesetzt (Abbildung 11); höhere

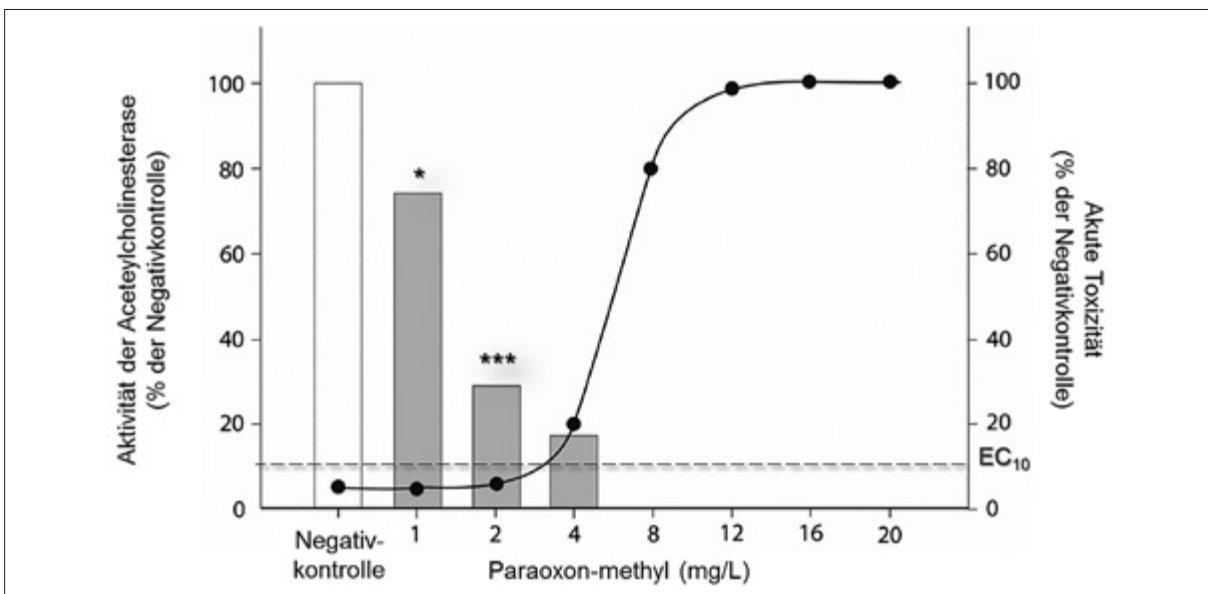
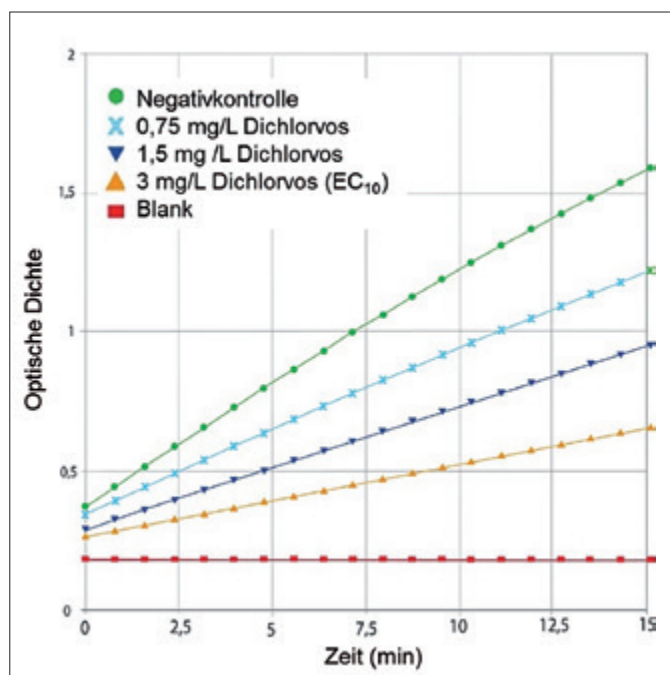


Abbildung 11: Spezifische Aktivitäten der Acetylcholinesterase sowie akute und subletale toxische Effekte in Embryonen des Zebrafisch (Danio rerio) nach 96 h Belastung mit Paraoxon-methyl. Die Hemmung der Acetylcholinesterase (linke Abszisse; graue Säulen in % Aktivität der Negativkontrolle = helle Säule) setzt bereits bei Substanzkonzentrationen deutlich unterhalb des EC10-Wertes ein (rechte Abszisse; Liniengrafik). Quelle: Kais et al. (2015).

Konzentrationen sollten nicht eingesetzt werden, da dann unspezifische toxische Effekte spezifische neurotoxische Effekte vortäuschen könnten.

Die Aktivität der Acetylcholinesterase kann über einen längeren Zeitraum mit hoher Präzision in dem in **Protokoll 112** beschriebenen Verfahren photometrisch in Mikrotiterplatten ermittelt werden (Abbildung 12).

Abbildung 12: Neurotoxische Wirkung verschiedener Konzentrationen des Phosphorsäureester-Pestizids Dichlorvos auf die Acetylcholinesterase in Embryonen des Zebrafisch (Danio rerio). Als Negativkontrolle dienen unbelastete Embryonen; der Blank wird aus Ansätzen ohne Embryonen ermittelt. Die Aktivität der Acetylcholinesterase kann über einen längeren Zeitraum als lineare Reaktion verfolgt werden (Stengel et al. 2017).



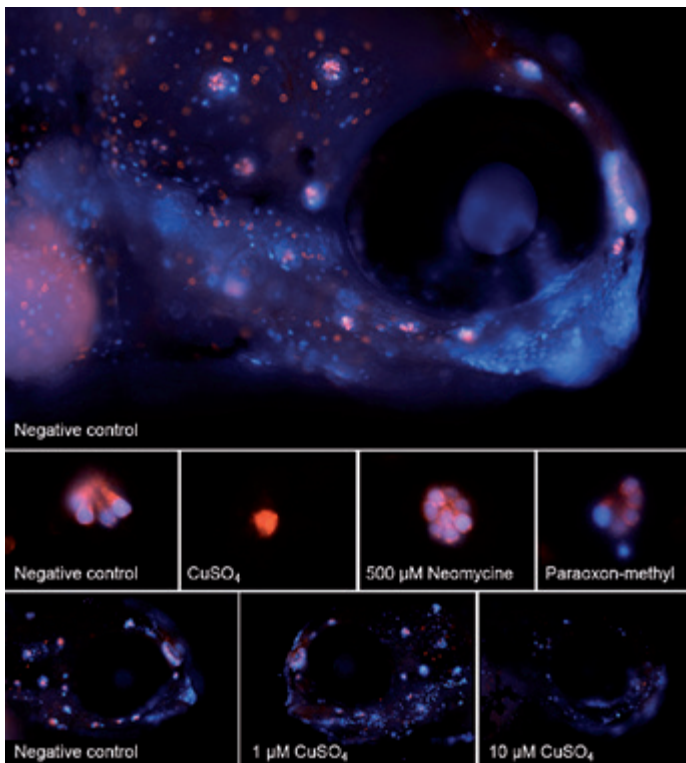
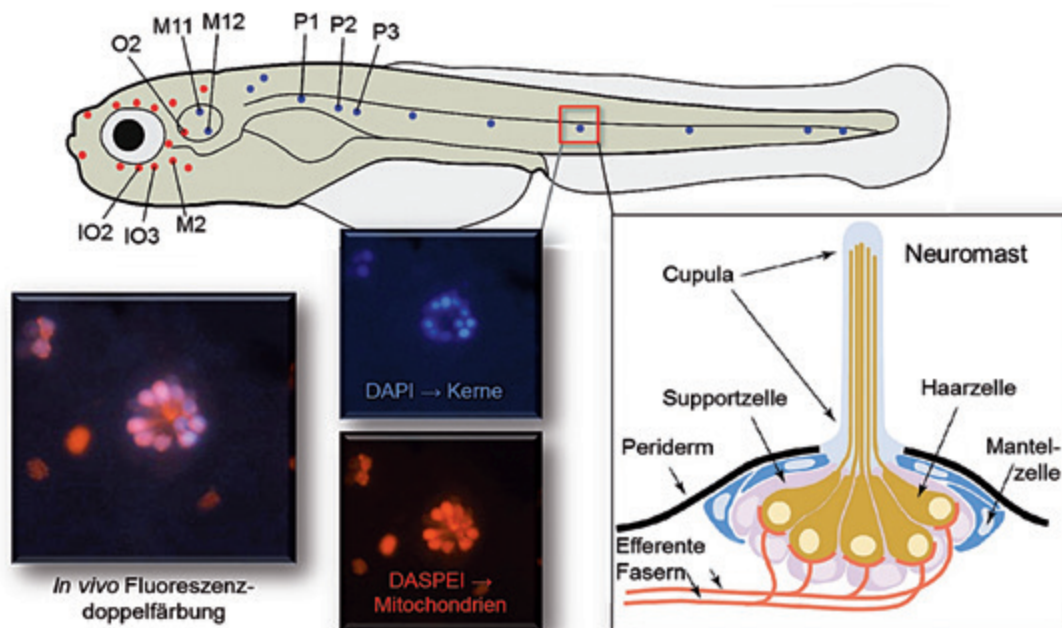


Abbildung 13: Auf der Basis einer Doppelfärbung mit DASPEI für die Mitochondrien und DAPI für die Kerne können Neuromasten im Seitenlinienorgan des Zebrafischembryos (*Danio rerio*) selektiv in vivo angefärbt werden (Stengel et al. 2017).

Abbildung 14: Fluoreszenzoptische Darstellung der Neuromasten am Kopf eines 96 h alten Embryos des Zebrafischembryos (*Danio rerio*) in der Kontrolle (großes Bild, NC) sowie nach Belastung mit Neomycin, Paraoxon-methyl und verschiedenen Konzentrationen von Kupfersulfat (Braunbeck et al. 2015).

In-vivo-Nachweis spezifischer neurotoxischer Wirkungen II: Neuromasten-Assay

Das Seitenlinienorgan von aquatischen Wirbeltieren besteht aus Neuromasten, sekundäre Sinneszellen, die den Haarzellen im Innenohr des Menschen entsprechen (Stengel et al. 2017); daher werden Veränderungen in den Neuromasten des Seitenlinienorgans auch als Indikatoren für eine Schädigung des Gehörsinns bei Säugetieren und dem Menschen eingesetzt. Neuromasten können mit einfachen Fluoreszenzfarbstoffen bereits in 72 h alten Embryonen des Zebraäbblings *in-vivo* dargestellt werden (Abbildung 13): Mit DASPEI ([2-[p-(Dimethylamino)styryl]ethylpyridiniumiodid) werden Mitochondrien, mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) werden die Kerne der Neuromasten angefärbt. Eine Schädigung der Neuromasten nach Belastung mit neurotoxischen Substanzen kann über eine Abnahme der Farbtintensität sichtbar gemacht werden (Abbildung 14; **Protokoll 113**).

Im Rahmen des Projekts Tox-Box wurde ein Atlas für substanzspezifische Veränderungen der Neuromasten erstellt, wobei die Effekte über ein vierstufiges Scoring quantifiziert wurden (Stengel et al. 2017; Tabelle 3).

Tabelle 3: Quantifizierung der Schädigung der Neuromasten im Seitenlinienorgan des Zebraäbblings (*Danio rerio*) nach kombinierter Färbung mit DAPI und DASPEI

Schädigungsgrad (Score) / Qualität der Färbung				
	0	1	2	3
0	Haarzellen vorhanden, gute Fluoreszenz			
1	Verringerte Haarzellzahl und/oder verringerte Fluoreszenz			
2	Wenige Haarzellen vorhanden, Fluoreszenz stark verringert			
3	Keine Fluoreszenz mehr erkennbar			

	0	1	2	3
P3				
P2				
P1				
MI2				
MI1				
O2				
M2				
IO3				
IO2				

Abbildung 15: Vierstufiges Scoring für substanzbedingte Schädigung der Neuromasten in 96 h alten Embryonen des Zebraäbblings (*Danio rerio*; Stengel et al. 2017).

Literatur:

- Al-Rawi NH, Atiyah KM (2009) Salivary neuron specific enolase: an indicator for neuronal damage in patients with ischemic stroke and stroke-prone patients *Clinical chemistry and laboratory medicine* 47:1519-1524 doi:10.1515/cclm.2009.345
- Bal-Price AK, Hogberg HT, Buzanska L, Coecke S (2010). „Relevance of in vitro neurotoxicity testing for regulatory requirements: Challenges to be considered.“ *Neurotoxicology and Teratology* 32(1): 36-41.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress *Nature reviews Drug discovery* 3:205-214 doi:10.1038/nrd1330
- Braunbeck T, Kais B, Lammer E, Otte J, Schneider K, Stengel D, Strecker R (2015) The fish embryo test (FET): origin, applications, and future *Environmental Science and Pollution Research* 22:16247-16261 doi:10.1007/s11356-014-3814-7
- Crofton KM et al. (2011) Developmental neurotoxicity testing: recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals *ALTEX* 28:9-15
- Cronin MT (1996) Quantitative structure-Activity relationship (QSAR) analysis of the acute sublethal neurotoxicity of solvents *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 10:103-110
- Dufour AP, Evans O, Behymer TD, Cantu R (2006) Water ingestion during swimming activities in a pool: a pilot study *Journal of water and health* 4:425-430
- Duis K, Scheider J, Warnecke D, Veen Avd, Coors A, Knacker† J, Schäfers C (eds) (2014) Substances of very high concern under REACH – an evaluation of uncertainties in the environmental risk assessment of endocrine active substances vol 37. vol 2014. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau
- Ei Yazal J, Rao SN, Mehl A, Slikker W, Jr. (2001) Prediction of organophosphorus acetylcholinesterase inhibition using three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) methods *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 63:223-232
- de Esch, C., Sliker, R., Wolterbeek, A.P.M., Woutersen, R.A., de Groot, D., 2012. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. *Neurotox. Teratol.* 34, 545-553.
- EU (2010) Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off J EU L* 276, 33-79
- Kais B, Stengel D, Batel A, Braunbeck T (2015) Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments *Environmental Science and Pollution Research* 22:16329-16339 doi:10.1007/s11356-014-4014-1
- Kim JH et al. (2007) Effect of Tremella fuciformis on the neurite outgrowth of PC12h cells and the improvement of memory in rats *Biological & pharmaceutical bulletin* 30:708-714
- He J, Ning H, Huang, R (2017) Low blood lead levels and attention-deficit hyperactivity disorder in children: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9799-2>
- Kroes R, Galli C, Munro I, Schilter B, Tran LA, Walker R, Würtzen G (2000) Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: A practical tool for assessing the need for toxicity testing *Food and Chemical Toxicology* 38:255-312 doi:[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00120-9)
- Küster E, Altenburger R (2006) Comparison of cholin- and carboxylesterase enzyme inhibition and visible effects in the zebra fish embryo bioassay under short-term paraoxon-methyl exposure *Biomarkers* 11:341-354 doi:10.1080/13547500600742136
- Lee, J., Freeman, J.L., 2014. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: A mini-review. *Neurotoxi-col.* 43, 57-64.
- Makhaeva GF, Radchenko EV, Baskin, II, Palyulin VA, Richardson RJ, Zefirov NS (2012) Combined QSAR studies of inhibitor properties of O-phosphorylated oximes toward serine esterases involved in neurotoxicity, drug metabolism and Alzheimer's disease SAR and QSAR in environmental research 23:627-647 doi:10.1080/1062936x.2012.679690
- Mates JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology *Toxicology* 153:83-104
- OECD (2007) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS - Developmental Neurotoxicity Study.
- OECD (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Publishing,

- Price CJ, Strong PL, Marr MC, Myers CB, Murray FJ (1996) Developmental Toxicity NOAEL and Postnatal Recovery in Rats Fed Boric Acid during Gestation *Fundamental and Applied Toxicology* 32:179-193 doi:<http://dx.doi.org/10.1006/faat.1996.0121>
- Selderslaghs, I., Hooyberghs, J., Blust, R., Witters, H.E., 2013. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 37, 44-56.
- Steinberg R, Gueniau C, Scarna H, Keller A, Worcel M, Pujol JF (1984) Experimental brain ischemia: neuron-specific enolase level in cerebrospinal fluid as an index of neuronal damage *Journal of neurochemistry* 43:19-24
- Stengel D, Zindler F, Braunbeck T (2017) An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 193:18-29 doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.11.001>
- Stern M, Gierse A, Tan S, Bicker G (2014) Human Ntera2 cells as a predictive in vitro test system for developmental neurotoxicity *Arch Toxicol* 88:127-136 doi:10.1007/s00204-013-1098-1
- Strähle U et al. (2012) Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments – A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations *Reproductive Toxicology* 33:128-132 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.121>
- Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 381-389.
- Ton, C., Lin, Y., Willett, C., 2006. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Research* 76, 553-567.
- US EPA (1996) Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 - Developmental Neurotoxicity Study. Washington, DC
- Weber C (2014) *Der Mensch bleibt unlesbar* vol 70. SZ Verlag, München

4 Modul endokrine Wirkungen

Henner Hollert, Thomas-Benjamin Seiler, Jochen Kuckelkorn, Sibylle Maletz, Regine Redelstein, Petra Waldmann, Birgit Kneib-Kissinger, Walter Schadenboeck

4.1 Definition des Wirkmechanismus und wissenschaftliche Grundlagen

Eine endokrin wirksame Substanz („Endokriner Disruptor oder kurz EDC“) ist nach Definition der WHO (2002) eine „exogene Substanz oder Gemisch, das die Funktion(en) des endokrinen Systems verändert und infolgedessen zu negativen gesundheitlichen Effekten eines intakten Organismus, dessen Nachkommen oder von (Teil-) Populationen führt.“ Zu den essentiellen Funktionen des Hormonsystems zählen die Homöostase, die Reproduktion, die Entwicklung und das Verhalten eines Individuums. Diese und andere werden in den Zielgeweben über Hormone und die entsprechenden Hormonrezeptoren reguliert. Durch Interaktion der EDCs mit der Synthese, der Sekretion, dem Transport, dem Bindungsverhalten oder der Aktivierung bzw. Elimination der körpereigenen, natürlichen Hormone können die Hormonkonzentrationen

im Körper ansteigen bzw. abfallen und dadurch diese Funktionen (negativ) beeinflusst werden (Burkhardt-Holm 2010).

Endokrin wirksame Stoffe sind in einer Vielzahl von Alltagsgegenständen sowie in verschiedenen chemischen Formulierungen enthalten (Duis et al. 2014). Aus diesen können sie über diverse Eintragspfade (z.B. Regenwassereinleitung, Kanalisation & Kläranlage, Versickerung & Grundwasserabfluss, Erosion, Deposition, Kunststoffmaterialien in Kontakt mit Trinkwasser) in den Wasserkreislauf gelangen. In nahezu allen Ökosystemen, die einem anthropogenen Einfluss unterliegen, konnten daher bereits anthropogene Stoffe nachgewiesen werden. Ein Teil dieser Stoffe zeigt dabei eindeutig endokrine Wirkungen. (Gavrilescu et al. 2015). Dadurch kann letztlich auch jeder Mensch diesen Stoffen zumindest in niedrigen Dosen ausgesetzt sein. Zum anderen gibt es Hinweise, dass endokrin

Vorkommen	Name	Anwendung
Körpereigene Hormone und Metabolite	Estron (E1) 17 β -Estradiol (E2) Estriol (E3) Testosteron (T)	
Künstliche Hormone	17 α -Ethinylestradiol (EE2)	Anti-Baby-Pille
Phytoestrogene	Isoflavone Lignane	Nahrungsergänzungsmittel Sedativa (Alternativmedizin)
Industriechemikalien	PCBs Flammschutzmittel Weichmacher	Hydraulikflüssigkeiten Weichmacher in Lacken, Isoliermitteln und Kunststoffen elektronische Geräte Polstermöbel und Teppiche Folien, Kabel und Gummiprodukte
Pestizide und Metabolite	DDT Lindan	Pflanzenschutzmittel und Biozide
Nebenprodukte bei industriellen Prozessen	Benzo[a]pyren Dioxine	Verbrennungsprodukte
Schwermetalle	Cadmium Blei	Korrosionsschutz (Halbleiterherstellung), Akkumulatoren Automobilindustrie / chemische Industrie

wirksame Substanzen auch bereits in sehr niedrigen Konzentrationen zu adversen Effekten führen können (Vandenberg et al. 2012). In der Ökotoxikologie wurde für Fische eine Auswirkung von 5 ng/L Ethinylestradiol bis auf die Populationsebene eindeutig nachgewiesen (Kidd et al. 2007). Zudem sind einige als endokrin wirksam bekannte Substanzen stark akkumulierend (z.B. PCB, DDT, Benzo[a]pyrene, Dioxine) und könnten so im Verlaufe der Zeit auch höhere Gewebekonzentrationen erreichen.

In Tabelle 4 sind chemische Kategorien von (potenziellen) endokrinen Disruptoren mit ausgewählten Beispielen aufgelistet.

Endokrin wirksame Substanzen in Gewässern sind aufgrund ihrer potenziell adversen Effekte für Tiere und Menschen seit Beginn der 1990er Jahre besonders in den Fokus des wissenschaftlichen und öffentlichen Interesses gerückt. Dabei können die adversen Effekte von endokrin wirksamen Substanzen nicht nur reprotoxischer Natur sein, sondern können sich auch in Form einer gentoxischen, neurotoxischen oder auch immuntoxischen Wirkung zeigen (siehe Abbildung 16, Choi et al. 2004). Insbesondere die Bedeutung der

endokrinen Disruptoren in der regulatorischen Praxis nimmt ständig zu und wurde von Hecker & Hollert (2011) aus einer internationalen Perspektive beleuchtet.

Im Jahr 2013 wurde gemeinsam vom United Nations Environment Programme (UNEP) und der WHO ein 289 Seiten umfassender Bericht mit dem Titel „State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012“ als ein Update des International Programme on Chemical Safety (IPCS) Dokumentes von 2002 veröffentlicht (WHO – World Health Organization 2002; WHO – World Health Organization and UNEP – United Nations Environment Programme 2013). Der Bericht fasst den derzeitigen globalen Status des Wissens zu den Wirkungen der EDCs auf Ökosysteme und den Menschen zusammen.

Die große Zahl der (potenziell) endokrin wirksamen Stoffe, die Vielfalt der bekannten und möglichen Wirkmechanismen sowie die Wirksamkeit einiger dieser Stoffe in sehr geringen Umweltkonzentrationen bestätigen zusätzlich die besondere Relevanz dieses Forschungsfeldes (Caliman & Gavrilescu 2009, Leusch 2008, Moltmann et al. 2007). Zu den öko-

toxikologisch relevanten Spurenstoffen gehören vor allem jene, welche bereits bei diesen geringen Konzentrationen signifikante (endokrine) Wirkungen erzeugen, wie beispielsweise 17 α -Ethinylestradiol (Kidd et al. 2007). Ihr Vorkommen in der Umwelt liegt bei sehr niedrigen Konzentrationen von <10 ng/L bis ungefähr 1 μ g/L (Fent 2013). Allge-

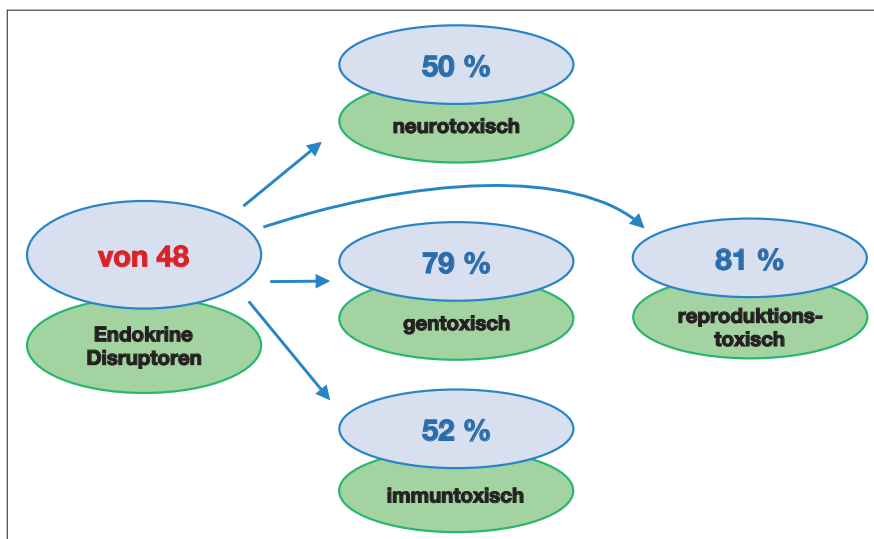


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung adverser Effekte endokriner Disruptoren (Choi et al. 2004)

mein zählen vor allem Substanzen dazu, die sich durch eine hohe Persistenz, Bioakkumulation und/oder eine hohe biologische Wirksamkeit auszeichnen. Aber auch eine hohe Polarität und geringe Sorption sind charakteristisch und ermöglichen somit letztendlich einen Eintrag dieser Stoffe ins Trinkwassersystem.

Bei den trinkwasserrelevanten, endokrin aktiven Spurenstoffen handelt es sich unter anderem um Pharmaka, Pestizide, Waschmittel, Flammenschutzmittel und Industriechemikalien (Eldridge & Stevens 2016, Tijani et al. 2016). Sie können über Industrieabwasser, die Landwirtschaft, den Ablauf von Oberflächen oder über Kläranlagen, welche diese Stoffe mithilfe der heutzutage gängigen Reinigungsverfahren nur teilweise oder gar nicht aus dem Abwasser eliminieren können, in das Grund- und Oberflächenwasser gelangen (Caliman et al. 2009, Chou et al. 2016, Kassotis et al. 2016).

In zahlreichen Untersuchungen konnte ein direkter Einfluss endokrin wirksamer Substanzen auf verschiedene aquatische Lebewesen wie Schnecken und Fische nachgewiesen werden (Jobling et al. 2004, Kidd et al. 2007, Oehlmann et al. 2007, Oehlmann et al. 2000, Pal et al. 2010, Schmitt et al. 2008, Schulte-Oehlmann et al. 2000, Sohoni et al. 2001, Tillmann et al. 2001). Systematische Messreihen existieren für das Trinkwasser nicht. Das sollte langfristig eingefordert werden. Die Hinweise aus den ökologischen Testreihen (Frühwarnsystem) und die Problematik der Kunststoffmaterialien in Kontakt mit Trinkwasser lassen endokrine Gefährdungspotenziale nicht zwingend ausschließen.

Des Weiteren werden EDCs auch als Auslöser von Beeinträchtigungen der menschlichen Gesundheit in Betracht gezogen (Dallinga et al. 2002, Morales-Suarez-Varela et al. 2011, Safe 2002, Toppari et al. 1996). Es wird vermutet, dass Xenoestrogene einen Einfluss auf den Pubertätsbeginn von jungen Mädchen (Aksglaede et al. 2009, Mouritsen et al. 2010), die Fruchtbarkeit von Frauen (Zama et al. 2016, Crain

et al. 2008) und Störungen des Menstruationszyklus bei Frauen (Cooper et al. 2005, Farr et al. 2004) haben. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass EDCs die Samenqualität von Männern reduzieren (Guo et al. 2000). Unbestritten ist der Einfluss von EDCs auf hormongesteuerte Krebsarten z.B. Brustkrebs (Doherty 2010). In einer weiteren Studie wurde der Nachweis auf endokrin wirksame Substanzen in Mineralwasser aus Plastikflaschen erbracht (Wagner & Oehlmann 2009). Zhang et al. (2017) fanden erhöhte Konzentrationen von Fluoren-9-bisphenol (BHPF), einen Ersatzstoff des viel diskutierten Bisphenol A, in Wasser aus Baby- und Kindertrinkflaschen aus verschiedensten Kunststoffen. Sie wiesen zudem in Versuchen mit Mäusen eine starke anti-östrogene Wirkung der Substanz nach; bis hin zu Störungen während der Schwangerschaft und eines Einflusses auf das Geburtsgewicht der Nachkommen. BHPF ist bisher allerdings in Europa nicht für die Verwendung in Kunststoffen für den Lebensmittelkontakt zugelassen.

4.2 Stand der Regulation

Bisher sind keine verbindlichen, gesetzlich festgeschriebenen Entscheidungskriterien zur Definition und Einstufung von Endokrinen Disruptoren (EDCs) in der EU verfügbar. Entsprechend findet bis heute keine umfassende Regulation von EDCs im Bereich des Umwelt- und Gesundheitsschutzes statt. So gibt es zum Beispiel weder Grenzwerte für hormonelle Aktivitäten in Trinkwasser, Grundwasser und Oberflächenwasser, noch die Pflicht diese überhaupt zu messen. Dies soll jedoch im Rahmen der neuen EU Trinkwasserrichtlinie, die derzeit in Arbeit ist, geändert werden

Aktivitäten der letzten Jahre bei der Europäischen Kommission zur verstärkten Regulation von EDCs wurden massiv von der Pestizide-produzierenden Industrie und deren Lobbygruppe beeinflusst. Aktuell gibt es von der Europäischen Kommission einen neuen Anlauf eine Definition für die Substanzklasse der EDCs festzuschreiben, die als Grundlage für eine

entsprechende Klassifizierung und Regulierung dienen soll. Das Ergebnis dieser Bemühungen ist jedoch weiter offen.

Zu den Maßnahmen, die bis jetzt dennoch getroffen wurden, gehört die Verwendungsbeschränkung von bekannten EDCs, wie zum Beispiel Bisphenol A, Nonylphenol oder Diethylhexylphthalat (DEHP). Verglichen mit der großen Anzahl an potenziellen EDCs und deren weitreichendem Einsatz in vielen Produkten des täglichen Gebrauchs sind diese Maßnahmen jedoch bei weitem nicht ausreichend.

Stärkeren Einfluss auf die Exposition des Menschen gegenüber EDCs haben Marktmechanismen. Gerade bei Baby- und Kindertrinkflaschen achtet der Verbrau-

cher verstärkt auf Label wie „BPA- und phthalatfrei“ und „Frei von Weichmachern“.

4.3 Teststrategie zur Bewertung endokriner Wirkungen

Nach der Analyse der Laborergebnisse wurde die nachfolgend dargestellte hierarchische Teststrategie vorgeschlagen (Abbildung 17).

Mit den jeweiligen Testsystemen sollten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen sowie minimal wirksame Konzentrationen (LOEC) ermittelt werden können, die dann in das GOW-Konzept einfließen. Sofern die angehängten Arbeitsanweisungen keine genaueren Angaben machen, sollten die zytotoxischen Effekte

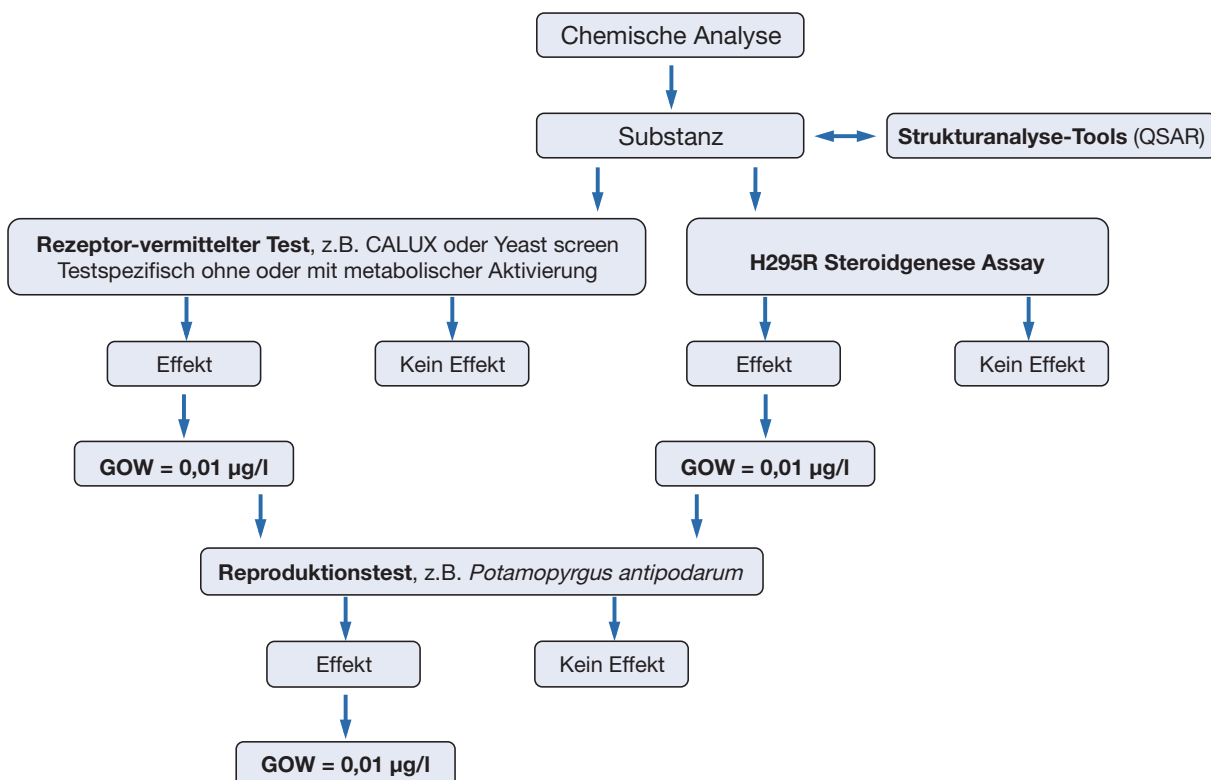


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Teststrategie für Endokrine Effekte

der Proben in den getesteten Konzentrationen jeweils nicht über 20 % liegen.

Vor Durchführung der ersten Schritte sollte die Testsubstanz, sofern die chemische Struktur bekannt ist, mittels ihrer Strukturmerkmale über QSAR-Programme bewertet werden. Diese können Voraussagen über (potenziell) aktive Metabolite treffen und die Entscheidung über die Reihenfolge der Versuche in Bezug auf die metabolische Aktivierung der Probe (z.B. mit Rattenleberhomogenat S9) vereinfachen.

Die zu untersuchende Einzelsubstanz wird dann in einem ersten Screening-Schritt auf mögliche endokrine Effekte untersucht. In diesem ersten Durchlauf werden Rezeptorvermittelte Tests vorgeschlagen, die einen hohen Probendurchsatz und eine schnelle Durchführung gewährleisten aber dennoch einen möglichen Effekt der Substanz sensitiv nachweisen können. Sofern die Einzelsubstanzen in dem Testsystem nicht metabolisiert werden, wird zusätzlich die metabolische Aktivierung der Probe durch einen S9-Mix (metabolische Komplementierung mit S9) empfohlen, um auch endokrin wirksame Metabolite zu erfassen, die zumindest im Säugerorganismus entstehen können. So können zusätzliche Informationen zu einer mög-

lichen humantoxikologischen Relevanz erhalten werden. Zur weiteren Bewertung einer Substanz sollte bei nachweisbaren endokrinen Effekten eine chemisch-analytische Bestimmung von möglichen Metaboliten durchgeführt werden (Brinkmann et al. 2014). Bei positivem Befund kann die Substanz dann im Sinn des GOW-Konzeptes bewertet werden.

Parallel dazu wird ein nicht Rezeptor-vermittelter Test empfohlen. Substanzen, die nicht über eine Rezeptorbindung endokrin aktiv werden, können über diesen Test trotzdem noch z.B. durch die Beeinflussung der Steroidgenese nachgewiesen werden. Diese Tests bieten zudem die Möglichkeit tiefergehende Mechanismus-spezifische Wirkweisen aufzuklären. Bei einem endokrinen Effekt wird die Substanz wiederum im GOW-Konzept bewertet.

Eine zusätzliche Bewertungsmöglichkeit stellt der Reproduktionstest mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* dar (Abbildung 18). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen *In-vitro*-Testsystemen werden hier Individuen-basierte Tests durchgeführt. Endokrine Effekte wirken sich bei diesem Test direkt auf die Anzahl der Nachkommen eines Muttertiers aus, was in begrenztem Umfang einen

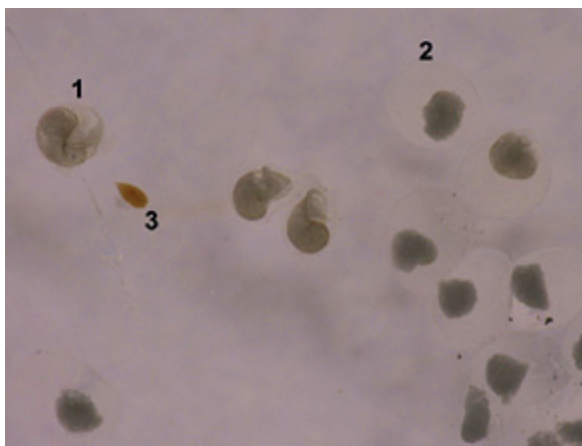


Abbildung 18: Die Stadien der Entwicklung (links): 1 Embryo mit Schale, 2 Embryo ohne Schale, 3 Schneckenei; Ausgewachsenes Elterntier (rechts)

Rückschluss auf potenzielle Auswirkungen auf die Population der Art zulässt. Dieser Test läuft über 28 Tage und eignet sich unter anderem für die Langzeit-Bewertung einer im Trinkwasser auftretenden Substanz.

Im Folgenden werden die durch das Modul Endokrine Effekte vorgeschlagenen Testsysteme zur Bewertung (potenziell) endokrin aktiver Substanzen innerhalb der Teststrategie kurz vorgestellt.

Detaillierte Testprotokolle, Guidelines und SOPs werden unter Punkt 4.4 bereitgestellt.

Testsysteme

ER α - und AR-CALUX[®]-Test

Der ER α - und der AR-Calux[®] Test (Estrogen-/Androgen-Responsive Chemical-Activated LUCiferase gene eXpression) ermitteln Rezeptor-vermittelte endokrine Aktivität mittels der humanen Osteosarkom-Zelllinie U2OS. Diese Zelllinie wurde mit den Reporterplasmiden pERetata-Luc bzw. pAREtata-Luc sowie den Expressionsplasmiden pSG5-neo-hER α bzw. pSG5-neo-hAR transfiziert. Infolge der Bindung eines aktivierten Agonist-Rezeptor-Komplexes an das entsprechende responsive element wird das Enzym Luciferase transkribiert (Legler et al. 1999, Sonneveld et al. 2005). Die Luciferasebildung ist umso stärker je mehr Komplexe mit Estrogenen/Androgenen oder Estrogen-/Androgen-ähnlichen Substanzen oder Substanzgemischen aus dem Trinkwasser eingegangen werden. Durch Zugabe eines „S9-Mix“ genannten Rattenleberhomogenats können die zu untersuchenden Substanzen zusätzlich metabolisch aktiviert werden (Kuckelkorn et al. 2018). Nach Zugabe des Substrates Luziferin kann anhand einer Lumineszenzmessung im Vergleich zur Referenzbelastung mit 17 β -Estradiol bzw. Dihydrotestosteron die Estrogen/Androgen-ähnliche Wirkung ermittelt werden. Über die Berechnung von Estradiol-/Testosteron-Äquivalenz-Faktoren

$$\left(\text{EEF/TEF} = \frac{\text{EC50 (E2/T)}}{\text{EC50 (Probe)}} \right)$$

aus der jeweiligen Dosis-Wirkungs-Kurve kann abschließend eine Einschätzung der endokrinen Wirksamkeit vorgenommen werden. Durch die Verwendung einer Basiskonzentration von 17 β -Estradiol bzw. Dihydrotestosteron im gesamten Testansatz und dem Einsatz von Standards der entsprechenden Rezeptor-Antagonisten Tamoxifen bzw. Flutamid können auch anti-Estrogen- bzw. anti-Androgen-ähnliche Wirkungen ermittelt und quantifiziert werden. Der ER α -/AR-Calux[®] wurde durch den Global Water Research Council basierend auf einem Interlaborvergleich mit komplexen Umweltproben für die Untersuchung von Grundwässern und Abwässern empfohlen (GWRC 2008). Zudem werden in einer aktuellen Vorlage zur ISO-Normierung (ISO 19040 Water quality – Determination of the estrogenic potential of water and waste water; Abschnitt 3) humanzellbasierte *In-vitro*-Reporter-Testsysteme zur Anwendung vorgeschlagen.

RYES/RYS

Die verwendeten Hefestämme (RYES/RYS, D.P. McDonnell, 1991) wurden gentechnisch derart verändert, dass in Anwesenheit von Kupferionen der humane Estrogen-/Androgenrezeptor gebildet wird. Des Weiteren wurde mittels Plasmid das Fusionsprodukt von einem spezifischen Antwortgen (Estrogen Responsive Element (ERE) bzw. Androgen Responsive Element (ARE)) und einem Reporter-Gen (LacZ, kodiert für β -Galaktosidase) eingeschleust. Der estrogen/androgen wirksame Stoff bindet an den spezifischen Rezeptor und aktiviert diesen. Dieser aktivierte Rezeptor wirkt als Transkriptionsfaktor und bindet an die jeweiligen Fusionsprodukte (ERE/ARE), so dass das LacZ-Gen transkribiert und die β -Galaktosidase gebildet wird. Das Enzym kann ein farbloses Substrat in Galaktose und einen Farbstoff spalten, was photometrisch detektiert wird. Der Test befindet sich derzeit ebenfalls in der ISO/DIN-Normung. Das Rezeptorplasmid des RYES (YePtrpER) trägt das Gen für den humanen Estrogenrezeptor α und einen Selektionsmarker (Tryptophanuxotrophie). Das Reporterplasmid (YrPE2ura) dieses Stammes trägt zwei Kopien eines durch den

Estrogenrezeptor aktivierbaren Gens (Vitellogenin), an die das Reporter-gen (*lacZ*-Gen) gekoppelt ist sowie einen Selektionsmarker (Uraciluxotrophie). Das Rezeptorplasmid des RYAS Stammes (Yep24*leu2*) trägt das Gen für den humanen Androgenrezeptor und einen Selektionsmarker (Leucinauxotrophie). Das Reporterplasmid (YrpG2*his*) trägt zwei Kopien eines androgenen Antwortgens, an die das *lacZ*-Gen gekoppelt ist sowie einen Selektionsmarker (Histidinauxotrophie).

H295R Steroidogenesis Assay

Der H295R Steroidogenesis Assay ist ein In-vitro-Testsystem für die Identifizierung Nicht-Rezeptor-gebundener Wirkungen endokriner Disruptoren (Hecker et al. 2011). Bei der verwendeten Zelllinie H295R handelt es sich um humane Nebennierenrinden-Karzinomzellen, die alle wichtigen Enzyme zur Synthese von Steroiden wie Estradiol, Testosteron und Progesteron sowie Glucocorticoiden bilden (Gazdar et al. 1990, Staels et al. 1993). Verschiedene Substanzen können die Expression und die Aktivität dieser Enzyme inhibieren oder induzieren. Eine etwaige Störung der Steroidsynthese wird zum einen über die Konzentration der gebildeten Steroide mittels eines kompetitiven Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) oder mittels LC/MS-MS analytisch gemessen. Zum anderen kann eine Veränderung der Genregulation mittels einer quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) nachgewiesen werden. Zusätzlich werden die belasteten Zellen auf ihre Vitalität getestet, um den Einfluss einer möglichen Zytotoxizität auf die Ergebnisse abzuschätzen. Der H295R Steroidogenesis Assay wird nach OECD-Richtlinie 456 durchgeführt (OECD 2011).

Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*

Der Reproduktionstest mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* detektiert über einen Zeitraum von 28 Tagen als *In-vivo*-Test endokrin aktive Substanzen in Wasser und Sedimenten (Duft et al. 2007, Schmitt et al. 2013) nach der OECD-Richtlinie for Testing of Chemicals 242 (Schmitt et al 2013,

OECD 2016). Durch die parthenogenetische Fortpflanzung der Schneckenweibchen über Ovoviviparie ist es möglich, die Embryonenzahl und somit die Reproduktionsleistung pro adulter Schnecke zu ermitteln. Die Substanzen und die Substanzgemische aus den Trinkwasserproben können anschließend aufgrund der Dosis-abhängigen endokrinen Wirkungsweise entweder als reproduktionshemmend oder -fördernd eingestuft werden (Duft et al. 2003). Daten aus diesem Testsystem ermöglichen außerdem eine direkte Abschätzung der Effekte für die Gesamtpopulation. Der Test mit *P. antipodarum* wurde seit 2012 international validiert, um seine Eignung als OECD-Methode zu überprüfen und liegt seit 2016 als OECD-Richtlinie 242 vor.

4.4 Testprotokolle der einzelnen Testverfahren und Ergebnisbewertung

Zur standardisierten Durchführung der Biotests wurden etablierte und evaluierte Testprotokolle der OECD sowie von universitären Forschungsinstituten verwendet.

- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 456 - H295R Steroidogenesis Assay (28.07.2011)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 242: *Potamopyrgus antipodarum* Reproduction Test (29.07.2016)
- Department Aquatic Ecotoxicology, Goethe University Frankfurt a. M. Schmitt et al. Draft Richtlinie for Testing of Chemicals – Reproduction test with the mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (01.2013)
- LFG Ökosystemanalyse, RWTH Aachen University. Maletz et al. und Kuckelkorn et al. Standard Operating Procedure (SOP) – ER α und AR Calux (12.02.2016 und 03.11.2016)

Literatur:

- Brinkmann M, Maletz S, Krauss M, Bluhm K, Schiwy S, Kuckelkorn J, Tiehm A, Brack W, Hollert H (2014): Heterocyclic aromatic hydrocarbons show estrogenic activity upon metabolization in a recombinant transactivation assay. *Environmental science & technology* 48, 5892-901
- Burkhardt-Holm, P. (2010). „Endocrine Disruptors and Water Quality: A State-of-the-Art Review.“ *Water Resources Development* 26(3): 477-493.
- Caliman FA, Gavrilesco M (2009): Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review. *Clean-Soil Air Water* 37, 277-303
- Choi, SM, Yoo SD, Lee BM (2004): Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 7(1): 1-24
- Chou H-M, Chao H-R, Lin C, Chiang P-C, Wang G-S, Tsou T-C (2016): An improved estrogenic activity reporter gene assay (T47D-KBluc) for detecting estrogenic activity in wastewater and drinking water. *Toxicological & Environmental Chemistry* 98, 376-384
- Cooper, G., Klebanoff, M., Promislow, J., Brock, J., & Longnecker, M. (2005). Polychlorinated Biphenyls and Menstrual Cycle Characteristics. *Epidemiology*, 16(2), 191-200. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/20486026>
- Crain, D. A., Janssen, S. J., Edwards, T. M., Heindel, J., Ho, S. M., Hunt, P., Iguchi, T., Juul, A., McLachlan, J. A. & Skakkebaek, N. (2008). Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertility and sterility*, 90(4), 911-940.
- Dallinga JW, Moonen EJC, Dumoulin JCM, Evers JLH, Geraedts JPM, Kleijnans JCS (2002): Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. *Human Reproduction* 17, 1973-1979
- Doherty, L. F., Bromer, J. G., Zhou, Y., Aldad, T. S., & Taylor, H. S. (2010). In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Hormones and Cancer*, 1(3), 146-155.
- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M, Oehlmann J (2003): Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology* 64, 437-449
- Duft M, Schmitt C, Bachmann J, Brandelik 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* 16, 169-182
- Duis K, Scheider J, Warnecke D, Veen Avd, Coors A, Knacker† T, Schäfers C (eds) (2014) Substances of very high concern under REACH – an evaluation of uncertainties in the environmental risk assessment of endocrine active substances vol 37. vol 2014. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau
- Eldridge JC, Stevens JT (2016): *Endocrine Toxicology*, Third Edition. CRC Press
- Farr, S. L., Cooper, G. S., Cai, J., Savitz, D. A., & Sandler, D. P. (2004). Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the Agricultural Health Study. *American journal of epidemiology*, 160(12), 1194-1204.
- Fent, K. (2013). *Ökotoxikologie: Umweltchemie-Toxikologie-Ökologie*, Georg Thieme Verlag
- Gavrilesco M, Demnerová K, Aamand J, Agathos S, Fava F (2015) Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation *New Biotechnology* 32:147-156 doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001>
- Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, Larocca RV (1990): Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell-Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid-Biosynthesis. *Cancer Research* 50, 5488-5496
- Guo, Y. L., Hsu, P. C., Hsu, C. C., & Lambert, G. H. (2000). Semen quality after prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *The Lancet*, 356(9237), 1240-1241
- GWRC 2008: Tools to Detect Estrogenic Activity in Environmental Waters
- Hecker M, Hollert H (2011): Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs. *Environmental Sciences Europe* 23, 15
- Hecker M, Hollert H, Cooper R, Vinggaard AM, Akahori Y, Murphy M, Nellemann C, Higley E, Newsted J, Laskey J, Buckalew A, Grund S, Maletz S, Giesy J, Timm G (2011): The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study. *Environmental Science and Pollution Research International* 18, 503-515

- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR (2004): Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent (vol 65, pg 205, 2003). *Aquatic Toxicology* 66, 205-222
- Kassotis CD, Iwanowicz LR, Akob DM, Cozzarelli IM, Mumford AC, Orem WH, Nagel SC (2016): Endocrine disrupting activities of surface water associated with a West Virginia oil and gas industry wastewater disposal site. *Science of The Total Environment* 557-558, 901-910
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW (2007): Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *P Natl Acad Sci USA* 104, 8897-8901
- Kuckelkorn J, Redelstein R, Heide T, Kunze J, Maletz S, Waldmann P, Grummt T, Seiler T-B, Hollert H (2018): A hierarchical testing strategy for micropollutants in drinking water regarding their potential endocrine-disrupting effects—towards health-related indicator values. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 4051-4065
- Legler J, van den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, van der Saag PT, Vethaak AD, van der Burg P (1999): Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological Sciences* 48, 55-66
- Leusch FDL 2008: Tools to Detect Estrogenic Activity in Environmental Waters, Global Water Research Coalition
- Moltmann JF, Liebig M, Knacker T (2007): Gewässerrelevanz endokriner Stoffe und Arzneimittel: Neubewertung des Vorkommens, Erarbeitung eines MonitoringKonzeptes sowie Ausarbeitung von Maßnahmen zur Reduzierung des Eintrags in Gewässer. In: Umweltbundesamt (Hrsg.), Dessau, pp. 129
- Morales-Suarez-Varela MM, Toft GV, Jensen MS, Ramlau-Hansen C, Kaerlev L, Thulstrup AM, Llopis-Gonzalez A, Olsen J, Bonde JP (2011): Parental occupational exposure to endocrine disrupting chemicals and male genital malformations: A study in the danish national birth cohort study. *Environ. Health* 10
- Mouritsen, A., Aksglaede, L., Sørensen, K., Mogensen, S. S., Leffers, H., Main, K. M., Frederiksen, K., Andersson, A.-M., Skakkebaek, N. E. & Juul, A. (2010). Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *International journal of andrology*, 33(2), 346-359.
- OECD (2011): Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay, OECD Publishing.
- OECD (2016). Test No. 242: Potamopyrgus antipodarum Reproduction Test, OECD Publishing.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B (2000): Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* 9, 383-397
- Oehlmann J, Di Benedetto P, Tillmann M, Duft M, Oetken M, Schulte-Oehlmann U (2007): Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. *Ecotoxicology* 16, 29-43
- Pal A, Gin KYH, Lin AYC, Reinhard M (2010): Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment* 408, 6062-6069
- Safe S (2002): Environmental estrogens: roles in male reproductive tract problems and in breast cancer. *Rev Environ Health* 17, 253-62
- 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*. *Environmental Pollution* 152, 322-329
- Schmitt C, Duft M, Brandelik C, Sieratowicz A, Geiss C, Ruppert K, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J (2013): Draft Guideline For Testing Of Chemicals: Reproduction test with the mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Department Aquatic Ecotoxicology Goethe University Frankfurt am Main
- Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J, Watermann B, Scherf S (2000): Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology* 9, 399-412
- Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M, Sumpter JP (2001): Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol a in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology* 35, 2917-2925
- Sonneveld E, Jansen HJ, Ritico JAC, Brouwer A, van der Burg B (2005): Development of Androgen- and Estrogen-Responsive Bioassays, Members of a Panel of Human Cell Line-Based Highly Selective Steroid-Responsive Bioassays. *Toxicological Sciences* 83, 136-148

- Staels B, Hum DW, Miller WL (1993): Regulation of Steroidogenesis in Ncl-H295 Cells - a Cellular-Model of the Human Fetal Adrenal. *Molecular Endocrinology* 7, 423-433
- Tijani JO, Fatoba OO, Babajide OO, Petrik LF (2016): Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 14, 27-49
- Tillmann M, Schulte-Oehlmann U, Duft M, Markert B, Oehlmann J (2001): Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10, 373-388
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, RajpertDeMeyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE (1996): Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Persp* 104, 741-803
- Vandenberg LN et al. (2012) Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses *Endocrine Reviews* 33:378-455 doi:10.1210/er.2011-1050
- Wagner M, Oehlmann J (2009): Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ Sci Pollut R* 16, 278-286
- WHO - World Health Organization (2002) Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. In: Damstra T, Barlow S, Bergman A (eds)
- WHO - World Health Organization, UNEP - United Nations Environment Programme (2013) State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012. In: Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller R (eds)
- Zama AM, Bhurke A, Uzumcu M (2016): Effects of Endocrine-disrupting Chemicals on Female Reproductive Health. *The Open Biotechnology Journal* 10
- Zhang Z et al. (2017) Fluorene-9-bisphenol is anti-oestrogenic and may cause adverse pregnancy outcomes in mice 8:14585 doi:10.1038/ncomms14585

5 Häufig gestellte Fragen (FAQ) zum GOW

1. Für welche Stoffe gibt es GOW?

GOW gibt es prinzipiell für alle Stoffe, die mit einer Konzentration $> 0,1 \mu\text{g/L}$ im Trinkwasser gefunden werden und die noch nicht ausreichend humantoxikologisch bewertet werden können, so dass ihnen noch **kein** Leit- oder Grenzwert zugewiesen werden konnte oder kann. Bei Substanzen, die aufgrund ihrer Struktur, Grund zu erhöhter Besorgnis bezüglich Genotoxizität erkennen lassen, werden auch bei Konzentrationen $< 0,1 \mu\text{g/L}$ entsprechende orientierende Bewertungen vorgenommen.

Hintergrundinformation:

Auf der Basis von ADI-Werten, d.h. auf Grundlage der Dosis, die ohne gesundheitliches Risiko täglich ein Leben lang aufgenommen werden kann (ADI = *Acceptable Daily Intake*) wird ein Trinkwasserleitwert berechnet. Analog zum ADI-Wert gibt der Trinkwasserleitwert die Höchstkonzentration des betreffenden Stoffes im Trinkwasser an, die ein Leben lang ohne Gesundheitsschädigung aufgenommen werden kann. In Übereinstimmung mit der Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird dabei mit einer täglichen Wasseraufnahme von 2 Litern gerechnet. Abweichend von den Empfehlungen der WHO wird aber innerhalb der EU eine Körpermasse von 70 kg (statt 60 kg) und eine 10%ige Ausschöpfung des ADI-Wertes über das Trinkwasser (statt 20 %) angenommen.

Grenzwerte sind in Gesetzen und Verordnungen politisch festgelegte Höchstkonzentrationen für natürliche Inhaltsstoffe, Wirkstoffrückstände und Umweltkontaminanten in Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen und Umweltmedien. Sie haben sich zur Regulation des Umgangs mit Chemikalien und vieler anderer potenzieller Noxen in allen Bereichen der Umwelt des Menschen bewährt. Toxikologen, Mediziner, Ökologen, Umwelttechniker und Ingenieure liefern dem Gesetzgeber Optionen für die Begründung von Notwendigkeit, Art und Höhe von Grenzwerten als wissenschaftlich (toxikologisch, medizinisch, ökologisch)

oder technisch (nutzungstechnisch, vermeidungstechnisch) abgeleitete Konzentrationen (Dieter 2011). Grenzwerte sind (wie Leitwerte) dabei als höchste Werte zu verstehen, für die bei lebenslanger Exposition keine gesundheitlichen Schäden zu besorgen und die insoweit noch akzeptabel sind.

2. Wer legt den GOW fest?

Die Methode zur Ableitung der GOWs ist veröffentlicht (Dieter 2014) und kann von Toxikologinnen und Toxikologen angewendet werden.

Das UBA leitet für einen gegebenen Stoff dann einen GOW ab, wenn die gefundenen Konzentrationen den allgemeinen Vorsorgewert für Stoffe im Trinkwasser von $0,1 \mu\text{g/L}$ überschreiten und ein Maßstab für die Bewertung gebraucht wird, d. h., ein Wasserversorger, das zuständige Gesundheitsamt, die Landesbehörde oder auch eine andere Stelle eine Bewertung der gefundenen Konzentration (und damit ggfls. einen GOW) angefragt hat.

Der Vorteil einer GOW-Ableitung durch das UBA ist eine konsistente und bundeseinheitliche Anwendung der Methode und damit auch der Bewertung selbst. GOW werden nicht (auch nicht vorsorglich) für Stoffe in Rohwässern (insbesondere Oberflächenwässern) festgelegt, wenn sie in aufbereitetem Trinkwasser ohne Relevanz sind.

3. Wie wird der GOW abgeleitet?

GOW werden entsprechend der vorhandenen Daten nach folgenden Stufen abgeleitet:

- a. Prüfung, ob Daten zur Genotoxizität vorhanden sind. Ist dies nicht der Fall oder die Daten belegen, dass der Stoff genotoxisch ist, gilt $\text{GOW}_1 = 0,1 \mu\text{g/L}$.
- b. Ein besonderer Fall sind wenige genotoxische Stoffe mit besonderer Relevanz im Menschen (z. B. we-

gen eines bekannten humanrelevanten Metabolismus), wie z. B. Nitrosamine. Für diese gilt ein GOW0 von 0,01 µg/L – ein Beispiel hierfür ist N-Nitrosodimethylamin (NDMA).

- c. Kann Genotoxizität ausgeschlossen werden, gilt GOW2 = 0,3 µg/L.
- d. Prüfung, ob Daten zur Neuro- oder Immuntoxizität vorliegen; kann diese ausgeschlossen werden, gilt GOW3 = 1,0 µg/L; ansonsten bleibt es bei GOW2 = 0,3 µg/L (Punkt c).
- e. Prüfung, ob Daten zur subchronischen Toxizität vorliegen; kann diese ausgeschlossen werden, gilt GOW4 = 3,0 µg/L; ansonsten bleibt es bei GOW3 = 1,0 µg/L (Punkt d).
- f. Prüfung, ob Daten zur chronischen Toxizität vorliegen; kann diese in für diesen Fall relevanter Höhe ausgeschlossen werden, gilt > 3,0 µg/L oder höher, je nach Datenlage. Ansonsten bleibt es bei GOW4 = 3,0 µg/L (Punkt e).

Sind für einen Endpunkt keine toxikologischen Daten verfügbar, kann über die im Leitfaden vorgeschlagene jeweilige Teststrategie eine Bewertung vorgenommen werden.

Die Festlegung der Höhe der Stufen beruht auf einer Auswertung von 140 Grenz- und Leitwerten von sechs größeren Behörden zu 50 verschiedenen Stoffen mit unterschiedlichen Wirkweisen seit 1993 (Dieter 2014).

Für jede der in den Stufen genannten Wirkungen wurden für die Festlegung der Höhe des entsprechenden GOW die jeweils niedrigsten Werte verwendet. Dadurch wird sichergestellt, dass im Falle einer späteren Vorlage der für einen Leit- oder Grenzwert notwendigen Tierversuchsdaten die daraufhin abgeleiteten Grenz- oder Leitwerte mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit höher liegen als der entsprechende GOW. Somit

führt die Verbesserung der toxikologischen Datenlage für den jeweiligen Stoff hinsichtlich der bisherigen Belastung in Höhe des GOW eher zu einer Entwarnung, d. h. einem höheren Wert als der bisherige GOW. Durch diesen gegenüber dem Schutzniveau eines Leit- oder Grenzwertes besonderen Vorsorgecharakter des GOW kann auch eine Verunsicherung der betroffenen Bevölkerung durch eine Absenkung des bisherigen Wertes vermieden werden.

4. Was ist ein humanrelevanter Metabolismus?

Der Körper kann sich vor Schadstoffen durch verschiedene Vorgänge schützen. Die Aufnahme über die Darmwand in den Blutkreislauf kann verringert oder verzögert werden und die Wirkstoffe können z.B. in der Leber über die Biotransformation metabolisiert und anschließend über die Galle ausgeschieden werden. Einige wenige, trinkwasserrelevante Schadstoffe besitzen jedoch eine chemische Struktur, mit der diese Schutzsysteme größtenteils unverändert überwunden und z. B. genotoxische Effekte ausgelöst werden können. Sie besitzen somit für die gesonderte Stufung als GOW0 (0,01 µg/L) einen relevanten Metabolismus.

5. Wo kann ich bereits begründete GOW finden?

Eine aktuelle Liste der GOW wird auf der folgenden Internetseite des UBA zur Verfügung gestellt: www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/trinkwasser/trinkwasserqualitaet/toxikologie-des-trinkwassers

Dort findet sich auch die Liste mit GOW für nach der Pflanzenschutzmittel-Verordnung nicht relevante Metaboliten (nrM) von Wirkstoffen aus Pflanzenschutzmitteln.

6. Was ist, wenn kein GOW für eine Substanz in den Tabellen des UBA zu finden ist?

Ist kein GOW vorhanden, wird dieser auf Anfrage durch das UBA festgelegt.

7. Wie lange hat ein GOW Bestand?

Bis zu einer Neubewertung durch neue toxikologische Daten.. GOW können aktualisiert, oder – im Idealfall – durch (Grenz- oder) Leitwerte abgelöst werden. Die bisherigen GOW verlieren dann immer ihre Gültigkeit.

8. Was passiert, wenn der GOW überschritten ist?

Ein GOW liegt deutlich im Vorsorgebereich und ist so gesetzt, dass bei lebenslanger täglicher Aufnahme des Stoffes mit 2 Litern Trinkwasser ausreichend sicher keine Gesundheitsschädigungen beim Menschen zu erwarten sind (siehe 3.). Auch bei einer (kurzzeitigen) Überschreitung um den Faktor von 10 dürften bei gleichzeitiger Einhaltung des unten genannten Vorsorgemaßnahmewertes keine unmittelbaren gesundheitlichen Schädigungen zu befürchten sein. Eine Überschreitung um den Faktor 10 ist grundsätzlich möglich, wobei der Vorsorgemaßnahmewert stark ereignisbezogen ist, d.h. für die Praxis, welche Maßnahmen werden eingeleitet um die Überschreitung des GOW zu minimieren.

Nach dem Verständnis der Trinkwasserverordnung sollten neben der Einhaltung von (Leit-, GOW-, insbesondere) Grenz-Werten immer Präventiv- und Minderungsmaßnahmen eingeleitet werden, um ein Unterschreiten des jeweiligen z. B. GOW zu erreichen. Neben der Verringerung von Konzentrationen, zusätzlichen Kontrollen und Überprüfungen gehört dazu auch das Schließen der Lücken toxikologischer Daten, um so eine bessere Bewertung zu ermöglichen. Über die Art der Maßnahmen ist immer im Einzelfall zu entscheiden.

Letztlich liegt die Verantwortung für die Festlegung des Vorsorgemaßnahmewertes jedoch beim zuständigen Gesundheitsamt. Dieses kann unabhängig von der Empfehlung des UBA höhere oder geringere Überschreitungen des GOW zulassen. Grundsätzlich sind aus Sicht des UBA Werte von $> 10 \mu\text{g/L}$ (Vorsorgemaßnahmenwert) über einen längeren Zeitraum jedoch nicht tolerabel.

9. Welche Übergangszeiträume bis zur Einhaltung des GOW können durch die Gesundheitsbehörden toleriert werden?

Für Stoffe, für die ein GOW abgeleitet ist, gilt in gesundheitlicher Hinsicht die Bestimmung des § 6 Abs. 1 TrinkwV. In einer Begründung der TrinkwV heißt es dazu, dass für eine Regulierung „die Eignung eines Stoffes, in einer Konzentration die menschliche Gesundheit zu schädigen, nach dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis als hinreichend wahrscheinlich betrachtet werden muss. Die entfernte Möglichkeit oder auch nur die allgemeine Besorgnis einer Gesundheitsgefährdung ist hingegen nicht ausreichend“. Von einem Stoff, der mit einem GOW belegt ist, kann allerdings nicht angenommen werden, dass bei Überschreitung des GOW vorbehaltlos von lebenslang gesundheitlich zu duldenen Konzentrationen auszugehen ist. Der GOW liegt zwar im Vorsorgebereich, ihm liegt aber mehr als nur eine entfernte Möglichkeit oder auch nur die allgemeine Besorgnis einer Gesundheitsgefährdung zugrunde. Maßnahmen gemäß §§ 6 Abs. 4 und 10 TrinkwV sind in rechtlicher Hinsicht einerseits nur auf Parameter der Anlage 2 TrinkwV begrenzt. Abhilfemaßnahmen, die das Gesundheitsamt bei Überschreitung eines chemischen Grenzwertes anordnen kann, betreffen gemäß § 9 Abs. 6 TrinkwV andererseits aber auch solche chemischen Stoffe, für die die TrinkwV keine Grenzwerte festlegt, die aber dennoch im Trinkwasser von gesundheitlicher Bedeutung sein könnten.

Das GOW-Konzept des UBA schließt wissenschaftlich begründet die Rechtslücke zwischen der Bewertbarkeit und dem Auftreten eines Stoffes ohne Grenzwert im Trinkwasser und für den wegen Datenmangels auch kein Leitwert abgeleitet werden kann.

In der Folge dieser Systematik empfiehlt das UBA bei der Überschreitung eines GOW analog der Methode bei einer Grenzwertüberschreitung vorzugehen (siehe u. a. Leitlinien für Maßnahmen im Vollzug der § 9 und 10 TrinkwV 2001). Dem steht folglich nicht entgegen, dass die zuständige Behörde für Maßnahmen nach festgestellter Überschreitung des GOW zunächst als eine praxisnahe Handlungsoption die Anwendung der „3-mal-3-Jahre-Regel“ nach § 10 TrinkwV in Erwägung zieht. Die erwartbare Dauer der Überschreitung wird bestimmt durch die mögliche Dauer der konkreten Maßnahme.

Der Mindestanspruch an Maßnahmen nach festgestellter Überschreitung eines GOW ist (analog der Überschreitung eines chemischen Grenzwertes), dass der Vorsorgemaßnahmenwert analog zu Maßnahmenhöchstwerten des UBA (siehe Leitlinien für Maßnahmen im Vollzug der § 9 und 10 TrinkwV 2001) während des gesamten Maßnahmenzeitraumes nicht überschritten wird.

10. Was passiert, wenn ein GOW niedriger ist als die analytische Nachweisgrenze eines Stoffes?

In diesem Fall, wie im Übrigen bei auch allen anderen Wertekategorien, gilt der GOW als eingehalten, wenn der Stoff analytisch nicht nachzuweisen ist. Dies ent-

bindet jedoch nicht von der Verpflichtung, die Nachweisgrenze möglichst soweit zu senken, dass die Einhaltung des GOW zuverlässig überwacht werden kann.

11. Können auch Stoffgemische mit dem GOW bewertet werden?

Es gibt derzeit noch keine Methode für die Bewertung von Stoffgemischen mit dem GOW-Konzept. Deshalb können GOW nur für die einzelnen Stoffe im Gemisch abgeleitet werden. Das GOW-Konzept ist aber ausreichend stark auf Vorsorge ausgelegt, dass auch beim Auftreten von mehreren Stoffen einer Gruppe mit keiner gesundheitlichen Besorgnis zu rechnen ist, wenn die GOW der Einzelstoffe eingehalten werden.

Bei Stoffen mit Wirkungsschwelle erübrigt sich deshalb auch die Anwendung z.B. der Additionsregel¹, solange kein GOW überschritten ist.

Bei Stoffen ohne Wirkungsschwelle, d.h. mit gentoxischem Wirkungspotenzial bedeutet „gesundheitliche Vorsorge“ dagegen, jeden einzelnen Stoff in der Mischung immer so zu begrenzen, wie von der Additionsregel vorgegeben. Dies bedeutet, dass die konzentrationsgewichtete Summe aller „gentoxischen Wirkpotenzen“ maximal einem Risikoindex von $RI = 1$ entsprechen sollte (Dieter 2014).

¹ Für die toxikologische Bewertung von mehreren Stoffen mit gleichen oder ähnlichen Wirkungsendpunkten in einem Stoffgemisch gilt der Risikoindex (RI) oder die Additionsregel: $RI = c_1/GK_1 + c_2/GK_2 + \dots + c_n/GK_n \leq 1$ mit c_1, c_2, \dots, c_n für die gemessenen Stoffkonzentrationen und GK_1, GK_2, \dots, GK_n für die Grenzkonzentrationen der Stoffe im Expositionsszenario.

Der Risikoindex ist also die Summe der Quotient aus den einzelnen gemessenen Expositionskonzentrationen zum korrespondierenden toxikologischen Vergleichswert, z.B. einer toxikologisch begründeten und abgeleiteten Grenzkonzentration für ein bestimmtes Expositionsmedium (z.B. Trinkwasser).

Literatur:

Dieter HH (2011) Grenzwerte, Leitwerte, Orientierungswerte, Maßnahmewerte - Aktuelle Definitionen und Höchstwerte Bundesgesundheitsblatt 52:1202-1206

Dieter HH (2014) Health related guide values for drinking-water since 1993 as guidance to assess presence of new analytes in drinking-water International Journal of Hygiene and Environmental Health 217:117-132
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.05.001>

Danksagung 6

In erster Linie möchten wir uns beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Finanzierung dieses Forschungsvorhabens bedanken (Förderkennzeichen: 02WRS1282).

Unser Dank gilt auch allen Mitarbeitern bei den Projektpartnern, die durch konstruktive Diskussionen und das Erstellen der Beiträge zu den einzelnen Modulen entscheidend an der Entstehung des vorliegenden Leitfadens mitgewirkt haben. Wir wollen uns in diesem Zusammenhang auch bei den nicht namentlich

genannten technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern bedanken, die unsere theoretischen Überlegungen in solide Daten verwandelt haben.

Bedanken möchten wir uns ebenso bei Frau Dr. Verena Höckele vom Projektträger Karlsruhe, die uns als geduldige Ansprechpartnerin in allen Belangen zur Verfügung stand. Unser Dank gilt ferner dem Team von Dr. Thomas Track von der DECHEMA sowie der GDCh in Frankfurt für die Bereitstellung von Räumlichkeiten für verschiedene Projekttreffen.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADI	Acceptable Daily Intake (erlaubte Tagesdosis)
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMGS	Bundesministeriums für Gesundheit und soziale Sicherheit
BPA	Bisphenol A
CDD ⁺ -ELISA	Cell Death Detection (CDD ⁺)- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
CLP	Classification, labelling and packing
CYP	Cytochrom P450
DCFH-DA	Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DIN	Deutsche Institut für Normung e.V.
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (Biomolekül und Trägerin der Erbinformation)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC-Wert	Effektive Konzentration bzw. Dosis
EDC	Endokriner Disruptor
EMA	Ethidiummonoazid
EU	Europäische Union
EURL-ECVAM	European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing
GOW	gesundheitlicher Orientierungswert
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GST	Glutathion-S-transferase
GSTT	Glutathion-S-transferase Theta
H295R	Nebennierenrindenkarzinomzellen
HTS	High-Throughput-Screening
ICH	International Conference on Harmonisation on Technical Requirements
ISO	Internationale Organisation für Normung
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie)
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
MMP	Mitochondrienmembranpotenzial
M _r	Relative Molekülmasse
NAT	N-Acetyltransferase

NaWaM	Nachhaltiges Wassermanagement
NHA	Normal Human Astrocytes (primäre humane Astrozyten)
NOEL	No Observed Effect Level
NSE	Neuriten-Spezifische Enolase
Ntera 2	humane differenzierungsfähige Zelllinie
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Co-operation and Development)
OSIRIS	Optimised Strategies for Risk Assessment of Industrial Chemicals through Integration of Non-Test and Test Information
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PI	Propidiumiodid
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationships
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RiSKWa	„Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
RTCA™	Real-Time Cell Analyzer
S9-Mix	Lebermikrosomen-Fraktion von Ratten
SH-SY5Y	Neuroblastomzelllinie
SULT	Sulfotransferase
TA 98 / TA 100 / TA 102 / TA 1535 ...	Bakterien-Teststämme im Ames-Test (<i>Salmonella typhimurium</i>)
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
ToxBox	Akronym für das BMBF-Verbundprojekt „Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung“
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
U2OS	Oberschenkel-Osteosarkomzelllinie
U.S. EPA	U.S. Environmental Protection Agency
UBA	Umweltbundesamt
UFZ	Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH / Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH
VICH	Veterinary International Conference on Harmonisation on Technical Requirements
VW _a	allgemeiner Vorsorgewert
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch World Health Organization)

8 Verfügbarkeit der Protokolle der genannten Nachweisverfahren

Für Nachweisverfahren, für die bereits national oder international standardisierte Protokolle oder Normen (OECD, ISO, DIN) vorliegen, sind diese bereits im Text erwähnt und sind über die entsprechenden Quellen zu beziehen. Die Standardarbeitsanweisungen (SOP) bisher nicht standardisierter Testverfahren sind bei den nachfolgend genannten Projektpartnern abrufbar.

Nachweisverfahren zur Bewertung der Genotoxizität

- RheinEnergie AG
Wasserlabor (WL)
Dr. Meike Kramer (m.kramer@rheinenergie.com)
Parkgürtel 24, 50823 Köln

Nachweisverfahren zur Bewertung der Neurotoxizität

- *In-vitro*-Neurotoxizität
Umweltbundesamt, Toxikologie des Trinkwassers und des Badebeckenwassers (FG II 3.6)
Dr. Tamara Grummt (tamara.grummt@uba.de)
Dr. Alexander Eckhardt (alexander.eckhardt@uba.de)
Ralf Junek (ralf.junek@uba.de)
Heinrich-Heine-Straße 12, 08645 Bad Elster
- *In-vivo*-Neurotoxizität
Universität Heidelberg
Center for Organismal Studies
Aquatische Ökologie und Toxikologie
apl. Prof. Dr. Thomas Braunbeck (braunbeck@uni-hd.de)
Im Neuenheimer Feld 504, 69120 Heidelberg

Nachweisverfahren zur Bewertung endokriner Wirkungen

- RWTH Aachen
Institut für Umweltforschung (Biologie V)
Prof. Henner Hollert (henner.hollert@bio5.rwth-aachen.de)
Worringerweg 1, 52074 Aachen
- Umweltbundesamt
Toxikologie des Trinkwassers und des Badebeckenwassers (FG II 3.6)
Dr. Tamara Grummt (tamara.grummt@uba.de)
Jochen Kuckelkorn (jochen.kuckelkorn@uba.de)
Ralf Junek (ralf.junek@uba.de)
Heinrich-Heine-Straße 12, 08645 Bad Elster

IMPRESSUM

Herausgeber:

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau

Ansprechpartner für die BMBF-Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“ RiSKWa:

Beim BMBF:

Dr. Christian Alecke
Bundeministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
Referat 724 - Ressourcen und Nachhaltigkeit
Heinemannstrasse 2
53175 Bonn
Tel.: +49 (0)228 9957-3890
Fax: +49 (0)228 9957-83890
E-Mail: christian.alecke@bmbf.bund.de

Beim Projektträger:

Dr. Verena Höcke
Projektträger Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1
76344 Eggenstein-Leopoldshafen
Tel.: +49 (0)721 608-24932
Fax: +49 (0)721 608-924932
E-Mail: verena.hoecke@kit.edu

Ansprechpartner für das BMBF-Verbundprojekt „Tox-Box – Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung“:

Dr. Tamara Grummt
Umweltbundesamt
Fachgebiet II 3.6 Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers
Heinrich-Heine-Strasse 12
08645 Bad Elster
Tel.: +49 (0)37437 76-354
Fax: +49 (0)37437 76-219
E-Mail: tamara.grummt@uba.de

Gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
Förderkennzeichen: 02WRS1282

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren der einzelnen Beiträge. Die Broschüre ist nicht für den gewerblichen Vertrieb bestimmt.

Erschienen im März 2018
zum Abschluss des BMBF-Verbundprojektes Tox-Box.

