

# Teststrategie für endokrin wirksame Substanzen – indikative und populationsrelevante Endpunkte

## Hintergrund

Bei der gesetzlichen Umweltrisikobewertung von Stoffen gibt es bislang keine Standardtestmethoden, die Störungen des sexual-endokrinen Systems von Fischen adäquat erfassen. Die Entwicklung geeigneter Testverfahren wird im OECD-Prüfrichtlinienprogramm angestrebt. Sexualendokrine Wirkungen sind für die Stoffbewertung insbesondere dann bedeutsam, wenn populationsrelevante Lebensleistungen betroffen sind (vor allem Sexualentwicklung und Reproduktion). In Einzelfällen haben Zulassungsbehörden schon länger Lebenszyklusstudien (Fish Full Life Cycle (FFLC) Tests) für die Stoffbewertung gefordert, etwa im Rahmen der Pflanzenschutzgesetzgebung. Unklar ist neben einem geeigneten Testprotokoll für FFLC-Tests nach wie vor, wie im Vorfeld ein Verdacht auf sexual-endokrine Wirkungen erhärtet werden kann und wann er zu einer definitiven Studie mit dem FFLC-Test führen sollte.

## Ziele

Die Unsicherheit, mit der die Bewertung von FFLC-Tests derzeit behaftet ist, sollte durch eine systematische Sammlung und Auswertung von relevanten Daten aus vorliegenden Studien eingeschätzt werden. Die Identifizierung empfindlicher populationsrelevanter sowie indikativer Endpunkte sollte zur Entwicklung von Testmethoden und Prüfstrategien beitragen.

## Projektbeschreibung

FFLC-Studien an Stoffen mit einem Verdachtspotenzial auf endokrine Wirkung wurden hinsichtlich der Aussagekraft der erhobenen Parameter für sexual-

endokrine Wirkungen überprüft. Ausgangspunkt der Untersuchung waren Studien des Fraunhofer IME mit Substanzen unterschiedlicher sexual-endokriner Wirkmechanismen wie direkte Hemmungen und Anregungen von Östrogen-(ER) oder Androgenrezeptoren (AR) sowie Hemmungen der Steroidsynthese-Enzyme (allgemein und Aromatase), die um relevante Studien aus der Literatur ergänzt wurden. Für die unterschiedlichen Wirkmechanismen wurde die Empfindlichkeit und Populationsrelevanz von Endpunkten verschiedener Fischarten verglichen. Des Weiteren wurden Messungen indikativer Endpunkte (Biomarker) aus Fish Screening-Assays (FSA) den Effektdaten von populationsrelevanten Endpunkten aus FFLC-Tests gegenübergestellt und bezüglich Empfindlichkeit und Vorhersagepotenzial bewertet.

## Ergebnisse

Die empfindlichste Expositionsphase ist zumeist die Zeit der Sexualentwicklung. Für die Östrogenrezeptor-Interaktionen manifestiert sich eine sexual-endokrine Wirkung am deutlichsten in der Befruchtungsrates, Wachstum und Geschlechtsentwicklung reagieren ähn-

lich sensitiv, aber mit artspezifischen Unterschieden. Die relevanteste Wirkung von Aromatase-Hemmern ist die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses. Für die bisher genannten Mechanismen ist die Vitellogeninkonzentration (VTG) im Blut ein empfindlicher Biomarker. Die Interaktionen mit dem Androgen-Rezeptor müssen nach agonistischer und antagonistischer Wirkweise unterschieden werden. Die Biomarker waren hier nicht immer aussagekräftig. Allerdings lassen sich die Aussagen nur für die Wirkmechanismen „Östrogenrezeptor-Anregung“ und „Aromatase-Hemmung“ auf eine ausreichend breite Datenlage stützen.

## Fazit

Unterschiedliche sexual-endokrine Wirkmechanismen manifestieren sich in unterschiedlichen indikativen und populationsrelevanten Endpunkten. Ein definitiver Test sollte immer die Sexualentwicklung einschließen. Die indikativen Biomarker im FSA waren für alle untersuchten Wirkmechanismen mit Ausnahme der Androgenrezeptor-Aktivierung ausreichend empfindlich, um einen definitiven Test zu triggern.

Table 1: Effect matrix to compare sensitivities of biomarker responses in Fish Screening Assays with the most sensitive population relevant endpoints from Fish Full Life Cycle Tests

Mode of Action	Test Substance	Screening Assay			Life Cycle Test/ Two-generation Test		
		VTG	11-kT	Reproductive endpoint	VTG	11-kT	Population-relevant endpoint
ER-Agonist	strong Ethinylestradiol	+	-	Fertilization rate	+	n.d.	Fertilization rate
	Alkylphenole	+	-	-	+	n.d.	
	weak Bisphenol A	+	-	-	+	n.d.	
ER-Antagonist	Tamoxifen-Citrate	-	-	Egg number	+	Fertilization rate	
AR-agonist	Trenbolone	-	0	Egg number	0	0	Sex ratio
AR-Antagonist	Flutamide	0	+	-	+	Egg number	
Aromatase-inhibitor	Fadrozole	-	+	n.d.	n.d.	n.d.	
	DMI-Fungicide	-	(-)	-	(-)	Sex ratio	
Inhibition of steroid synthesis	3,4-DCA	-	-	n.d.	-*	Egg number	
	Atrazine	-	-	-	n.d.		

ER = estrogen receptor; AR = androgen receptor; VTG = vitellogenin; 11-kT = 11-keto testosterone n.d. = not determined; + = increase; - = decrease; 0 = no effect

# Testing Strategy for Endocrine Disruption Compounds – Indicative and Population Relevant Endpoints

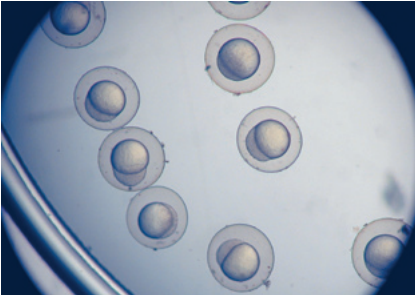


Figure 1:  
Determination of fertilization rate by evaluation of early blastula stages on freshly fertilized egg

## Background

For the purposes of environmental risk assessment, existing standard test methods are insufficient to detect disruptions in the sexual endocrine system of fish. The development of adequate test methods is an important goal of the OECD Test Guideline program. Sexual endocrine effects have to be taken into account, when assessing the potential hazards in substances, especially when these may affect factors relevant to population such as sexual development, or reproduction. In certain cases, regulative authorities already require Fish Full Life Cycle (FFLC) Tests to be considered in risk assessment, especially regarding pesticide registration. Besides an appropriate test protocol for FFLC tests, appropriate procedures for confirming suspicions of sexual endocrine effects and triggering definitive tests still have to be elaborated.

## Objective

The scope of the study was to assess uncertainties in evaluating FFLC tests by systematic collection and evaluation of existing data from relevant studies. The identification of sensitive indicative and population-relevant endpoints should contribute to improving existing test methods and strategies.

## Approach

In the first part of the study the emphasis was on the detection of population-relevant and indicative endpoints regarding different sexual endocrine modes of action (MoA). For practical reasons, sexual-endocrine effects were classified in interactions with the estrogen (ER) and androgen (AR) receptors (agonism and antagonism) and interactions with enzymes, such as aromatase involved in steroid synthesis. For evaluation, data from FFLC tests performed at the Fraunhofer IME and data from the literature were used. In the second part, results from Fish Screening Assays (FSA) regarding indicative endpoints (biomarkers) were compared to population-relevant FFLC endpoints concerning sensitivity. The predictive capability of biomarker responses from FSAs compared to the most sensitive endpoints from FFLC tests was assessed.

## Results

An adequate database is available only for the MoAs estrogen receptor agonists and aromatase inhibitors. In most cases the most susceptible time window of exposure seemed to be the phase of sexual development. For interactions regarding the ER, a sexual endocrine effect is most apparent in the reproductive parameter fertilization rate, whereas growth and sexual development are of similar sensitivity, although with differing manifestation in different test species. The most important effect of Aromatase inhibitors is in altering the sex ratio. However, they also affect juvenile growth. The available FSA results showed corresponding sensitivity of VTG as indicative endpoint for all MoAs presented so far. Interactions with the androgen-

receptor should be divided into agonistic and antagonistic MoAs. For the AR antagonist the most sensitive population-relevant endpoint seems to be fecundity (expressed as spawned eggs per female), whereas for the agonists, this is sex ratio. For AR antagonists 11-keto testosterone (11-kT) was shown to be a biomarker of suitable sensitivity, whereas a safe biomarker for AR agonists still has to be identified.

## Conclusion

Different sexual endocrine MoAs become manifest in different indicative and population relevant endpoints. A definitive test should always include exposure of the sexual development phase. Except for the AR interactions, the FSA, representing the first tier *in vivo* study, shows adequate sensitivity of the biomarker VTG for all MoA and is appropriate for triggering the definitive test used in risk assessment. For AR antagonists, the FSA may be added by the investigation of 11-kT titers.

Parts of the project were carried out for the German Federal Environment Agency and financially supported by the Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety.

## Contact/Ansprechpartner

Matthias Teigeler  
Tel: +49 2972 302-163  
matthias.teigeler@ime.fraunhofer.de

Dr. Christoph Schäfers  
Tel: +49 2972 302-270  
christoph.schaefers@ime.fraunhofer.de