

Neues aus der Forschung: Xenoöstrogene (siehe UWSF 8/5, 274, 1996)

Nicht reproduzierbar:

Versuchsergebnisse zur synergistischen Wirkung von Xenoöstrogenen

Michael Gülden, Hasso Seibert

Institut für Toxikologie, Universität Kiel, Weimarer Str. 8, Haus 3, D-24106 Kiel

1 Einleitung

Unter der Rubrik "Neues aus der Forschung" wurde in UWSF 5/96 (GÜLDEN & SEIBERT, 1996) über Untersuchungen von ARNOLD et al. (1996) berichtet, in denen außergewöhnlich hohe synergistische Wechselwirkungen der Pestizide Endosulfan, Dieldrin, Chlordan und Toxaphen bei der Bindung an rekombinante menschliche Östrogenrezeptoren und bei der Aktivierung östrogenabhängiger Gene gentechnisch veränderter Hefen (YES: yeast estrogen system) gefunden wurden. Äquimolare Zweierkombinationen dieser Pestizide waren um mehr als das 100fache potenter als die Einzelverbindungen. Aus diesen Ergebnissen schlußfolgerten ARNOLD et al. (1996), daß die Potenz einiger schwach östrogen aktiver Chemikalien in der Umwelt anhand von Einzelsubstanz-Untersuchungen unterschätzt werden könnte.

Tiere und Menschen können einer Vielzahl von östrogenartig wirkenden natürlichen und naturfremden Verbindungen ausgesetzt sein. Dazu zählen körpereigene Östrogene, Phyto- und Mykoöstrogene, medizinisch eingesetzte synthetische Östrogene (z.B. in Kontrazeptiva) sowie eine Reihe von Umweltchemikalien (SEIBERT, 1996; GÜLDEN et al., 1997). Bisher war man davon ausgegangen, daß sich mehrere gleichzeitig anwesende östrogen wirksame Chemikalien in ihrer Wirkung gegenseitig nicht beeinflussen, sondern additiv (im Sinne von Konzentrations-Additivität, vgl. GRIMME et al., 1996) wirken. Prinzipiell ist es bei additiver Wirkung möglich, die östrogene Aktivität eines Gemisches bei Kenntnis der Potenz und der Konzentration jeder im Gemisch vorliegenden Einzelsubstanz vorherzusagen. Dies ist bei synergistischer (überadditiver) Kombinationswirkung nicht möglich. Die Untersuchungen von ARNOLD et al. (1996) erregten deshalb großes Aufsehen.

2 Neue Versuchsergebnisse

Verschiedene Arbeitsgruppen (RAMAMOORTHY et al., 1997, ASHBY et al., 1997) haben seither versucht, die Ergebnisse von ARNOLD et al. (1996) zu verifizieren. In **keinem** Fall konnten die von diesen Autoren beschriebenen synergistischen Kombinationswirkungen reproduziert werden.

RAMAMOORTHY et al. (1997) untersuchten die östrogene Aktivität von Dieldrin, Toxaphen und ihrer äquimolaren Mischung mit insgesamt 10 verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Methoden, mit denen verschiedene Ebenen der Östrogenwirkung (Rezeptorbindung, Genaktivierung, Zellantwort, Organveränderung) erfaßt werden können:

- *In vivo* wurde die Wirkung auf den Uterus juveniler Mäuse anhand von drei Parametern (Uterusgewicht, Progesteronrezeptorgehalt, Peroxidaseaktivität) untersucht. Dieldrin und Toxaphen waren in den höchsten untersuchten Dosierungen ($6 \cdot 10^{-5}$ mol/kg, höhere Dosierungen waren toxisch) nicht östrogen aktiv. Die Kombination beider Pestizide bewirkte ebenfalls keine Erhöhung des Uterusgewichtes bzw. der Peroxidaseaktivität, allerdings eine schwache, aber nicht konzentrationsabhängige Erhöhung des Progesteronrezeptorgehaltes im Uterus; d.h., zumindest für zwei der drei erfaßten Endpunkte konnte *in vivo* kein Anzeichen für eine synergistische Wirkung des Dieldrin/Toxaphen-Gemisches beobachtet werden.
- *In vitro* wurde (1) die Bindung an Östrogenrezeptoren im Uterushomogenat von Mäusen und in kultivierten menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7 Zellen) untersucht, (2) die Aktivierung von östrogensensitiven Reportergenen in zwei unterschiedlich gentechnisch veränderten MCF-7 Zelllinien und in zwei unterschiedlichen, gentechnisch veränderten Hefestämmen gemessen und (3) die östrogenabhängige Stimulierung des Wachstums von MCF-7 Zellen erfaßt. Die höchsten untersuchten Konzentrationen von Dieldrin und Toxaphen waren 10^{-5} - 10^{-4} M. In den meisten Fällen erwiesen sich Dieldrin und Toxaphen als inaktiv. Dieldrin und Toxaphen waren schwach aktiv in einem der beiden Hefe-Tests und Toxaphen außerdem auch im Rezeptorbindungssay mit MCF-7 Zellen und (allerdings nur bei der niedrigsten Konzentration) im Proliferationsassay mit MCF-7 Zellen. In keinem Fall wurde eine synergistische Wirkung der Kombination von Dieldrin und Toxaphen beobachtet. Diese Ergebnisse stehen in deutlichem Gegensatz zu denen von ARNOLD et al. (1996), die zwar auch nur eine schwache Östrogenrezeptorbindung und Reportergen-

aktivierung durch Dieldrin und Toxaphen bei 10^{-5} M und höheren Konzentrationen beobachteten, die aber diese Effekte mit der Kombination beider Pestizide bereits bei weniger als 1/100 dieser Konzentration auslösen konnten.

- Mit beiden Hefe-Tests wurden außer Dieldrin und Toxaphen auch die beiden anderen von ARNOLD et al. (1996) untersuchten Pestizide, Endosulfan und Chlordan, und äquimolare Zweierkombinationen der vier Pestizide untersucht. Im Unterschied zu ARNOLD et al. (1996) konnte keine synergistische Wirkung irgendeiner der Zweierkombinationen beobachtet werden.

ASHBY et al. (1997) untersuchten Dieldrin, Endosulfan und zusätzlich das seit langem als östrogen wirksam bekannte Insektizid Methoxychlor. Sowohl in einem östrogen-sensitiven Reporterassay mit transformierten Hefen als auch im Uterusgewichtstest mit juvenilen Ratten waren Dieldrin und Toxaphen in Konzentrationen bis zu 10^{-5} M bzw. Dosierungen bis zu 100 mg/kg (ca. $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/kg) inaktiv, ebenso deren äquimolare Kombination. Methoxychlor war in beiden Tests aktiv. Die östrogene Potenz konnte durch Kombination mit Dieldrin jedoch nicht gesteigert werden; d.h., auch ASHBY et al. (1997) konnten weder *in vitro* noch *in vivo* synergistische östrogene Kombinations-effekte beobachten.

3 Widerruf

Ein zumindest vorläufiges Ende dürfte die Diskussion um synergistische Wirkungen von Xenoöstrogenen nun dadurch gefunden haben, daß JOHN A. McLACHLAN, einer der Mit-Autoren der 1996 von ARNOLD et al. publizierten Untersuchung, diese Publikation in der jüngsten Ausgabe der Zeitschrift "Science" (25. Juli 1997) offiziell zurückgezogen hat. Zur Begründung wird angegeben, daß die Autoren die 1996 beschriebenen Versuche jüngst im eigenen Labor wiederholt hätten, dabei aber nicht in der Lage gewesen seien, ihre ursprünglichen Ergebnisse zu reproduzieren. Unbefrie-

digenderweise wird keine Erklärung dazu geliefert, wie es zu den ursprünglich publizierten Resultaten kommen konnte. Es wird lediglich festgestellt, "that there must have been a fundamental flaw in the design of our original experiment".

4 Schlußfolgerung

Wie auch immer man diesen Vorgang beurteilt, klar ist, daß durch diesen Widerruf sowie durch die oben dargestellten Resultate anderer Laboratorien der Diskussion um synergistische Wirkungen von Xenoöstrogenen weitgehend die Grundlage entzogen worden ist.

5 Literatur

- ARNOLD, S.F.; D.M. KLOTZ; B.M. COLLINS; L.J. VONIER; L.J. GUILLETTE JR.; J.A. McLACHLAN (1996): Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272: 1489-1492
- ASHBY, J.; P.A. LEFFVRE; J. ODUM; C.A. HARRIS; E.J. ROUTLEDGE; J.P. SUMPTER (1997): Synergy between synthetic oestrogens? *Nature* 385: 494
- GRIMME, L.H.; R. ALTENBURGER; W. BÖDEKER; M. FAUST (1996): Kombinationswirkungen in der aquatischen Toxikologie. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 8: 150-158
- GÜLDEN, M.; H. SEIBERT (1996): Synergistische Wirkung von Xenoöstrogenen. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 8: 274
- GÜLDEN, M.; A. TURAN; H. SEIBERT (1997): Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. *Umweltbundesamt-Forschungsbericht 102 04 279* (im Druck)
- McLACHLAN, J.A. (1997): Synergistic effect of environmental estrogens: Report withdrawn. *Science* 277: 462-463
- RAMAMOORTHY, K.; F. WANG; I. CHEN; J.D. NORRIS; D.P. McDONNELL; L.S. LEONARD; K.W. GAIDO; W.P. BOCCINFUSO; K.S. KORACH; S. SAFE (1997): Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphen mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: No apparent synergism. *Endocrinology* 138: 1520-1527
- SEIBERT, H. (1996): Endokrin wirksame Chemikalien in der Umwelt: Störungen der Entwicklung und Funktion des männlichen Reproduktionssystems. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 8: 275-284

Der Industrieverband Agrar e.V. (iva) informiert:

Kombinationswirkungen bei hormonähnlich wirkenden Chemikalien nicht nachgewiesen

Das Team um John McLACHLAN berichtete vor einem Jahr, daß einige Pflanzenschutzwirkstoffe - Chlordan, Dieldrin, Toxaphen und Endosulfan -, die einzeln keine oder geringe Effekte auslösen, in Kombination miteinander die 160- bis 1600fache Wirkung zeigen.

Zahlreiche Studien belegen, daß es für hormonähnliche Wirkungen von Chemikalien Schwellenwerte gibt und daß die üblicherweise anzutreffenden Konzentrationen dieser Stoffe in der Umwelt weit unterhalb dieser Werte liegen. Nach dem Bericht in "Science" schien dieses Erkenntnis nicht mehr gesichert. Da Stoffe, denen man hormonähnliche Wirkungen

unterstellt, praktisch überall vorkommen, u.a. in Chemikalien, die für Shampoos, Waschmittel oder Plastikartikel verwendet werden, schien plötzlich ein großer Teil der Bevölkerung gefährdet. Dies hatte in den USA zur Folge, daß seit Dezember vergangenen Jahres alle Chemikalien auf hormonähnliche Wirkungen getestet werden müssen, bevor sie auf den Markt gebracht werden dürfen.

John McLACHLAN schreibt jetzt in "Science": Es ist klar, daß alle Folgerungen aus der damaligen Veröffentlichung zurückgenommen werden müssen, bis ein eindeutiger wissenschaftlicher Beweis vorliegt - falls das jemals der Fall sein sollte."

Quelle: iva Informationen vom 31. Juli 1997. Industrieverband Agrar e.V., Karlstraße 21, D-60329 Frankfurt