

„Die Wirkung von Pharmaka und Pestiziden einzeln und in Kombination auf die Embryonalentwicklung des Zebrafischblings (*Danio rerio*)“

## **Zusammenfassung der Arbeit**

### **1. Einleitung**

Arzneimittel werden in großem Umfang in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt. Die Frage nach den Folgen des Arzneimittelkonsums für die Umwelt spielte lange Zeit keine große Rolle. Erst als Anfang der neunziger Jahre eher zufällig im Rahmen eines Routinemessprogramms für Pflanzenschutzmittel, der dem Herbizid Mecoprop isomere Lipidsenker-Metabolit Clofibrinsäure in Berliner Oberflächen-, Trink- und Grundwasser nachgewiesen wurde und zudem ein negativer Einfluss des Schmerzmittels Diclofenac auf Geierpopulationen auf dem indischen Subkontinent gezeigt werden konnte, setzte ein Umdenken ein. Nachfolgende Untersuchungen haben ferner gezeigt, dass es sich nicht nur um ein regionales Problem handelt und nicht nur Clofibrinsäure und Diclofenac in Umweltproben vorhanden sind. Insgesamt wurden bisher mehr als 100 verschiedene Pharmaka und zahlreiche Metabolite in der Umwelt nachgewiesen. Pharmaka sind damit in der Umwelt nicht als vereinzelt auftretenden Verunreinigungen sondern ubiquitäre Kontaminanten anzusehen.

Arzneimittel sind nach dem Arzneimittelgesetz als Stoffe oder Zubereitungen von Stoffen definiert, die dazu bestimmt sind, durch ihre Anwendung am bzw. im Körper von Mensch und Tier „Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen“ sowie „Krankheitserreger, Parasiten oder körperfremde Stoffe abzuwehren, zu beseitigen oder unschädlich zu machen“. Diese chemisch sehr diversen Substanzen werden also gezielt als Stoffe mit biologischen Wirkungen entwickelt. Um im Körper die gewünschte Wirkung hervorrufen zu können, besitzen die Substanzen bestimmte Stoffeigenschaften, die sie jedoch auch zu einem Risiko für die Umwelt werden lassen: Sie sind biologisch wirksam; lange stabil und lagerfähig, auch stabil gegen Enzyme und sauren pH sowie gut wasserlöslich. Sie besitzen jedoch auch eine gewisse Lipophilie, um Membranen passieren zu können. Im Gegensatz zu Pestiziden, die periodisch zum Einsatz kommen, werden Arzneimittel zudem kontinuierlich in die Umwelt eingetragen. Daher kann man davon ausgehen, dass Arzneimittel in der Umwelt auch Effekte an sog. Nichtziel-Organismen hervorrufen und ggf. auch in der Umwelt akkumulieren können.

Pharmaka zählen zwar zu den toxikologisch bestuntersuchten und charakterisierten Substanzen, doch trotz ihres intensiven Einsatzes sind bisher die Konsequenzen des Eintrages in die Umwelt und die damit verbundene geringe, jedoch permanente Exposition von Nichtziel-Organismen gegenüber Arzneimitteln ökotoxikologisch weit weniger gut untersucht. Wenn in der Literatur Daten zu Ökotoxizität vorhanden sind, so sind bisher meist nur Einzelstoffe untersucht worden. In der Realität sind allerdings Arzneimittel nicht die einzigen Kontaminanten eines Ökosystems. Aquatische (und auch terrestrische) Organismen sind in aller Regel gegenüber Mischungen aus Pharmaka und anderen Substanzen, wie z.B. Pestiziden und Industriechemikalien - der sogenannten komplexen Matrix - exponiert.

## 2. Material & Methoden

Aufgrund der geschilderten Problematik wurden in der vorliegenden Arbeit 33 Arzneimitteln und drei Pflanzenschutzmittel einzeln sowie in Kombination im Embryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*, DarT) entsprechend des Verfahrensvorschlages von Nagel (1998)<sup>1</sup> untersucht. Dieses Modell, das von Schulte & Nagel (1994)<sup>2</sup> als Alternativmethode für den akuten Fischtest nach OECD 203 entwickelt wurde, bietet den Vorteil neben letalen auch verschiedene subletale Effekte erfassen zu können, die einen Hinweis auf den Wirkmechanismus der untersuchten Substanz geben können. Aufgrund der Testdauer von nur 48 Stunden war es zudem möglich eine größere Anzahl von Stoffen untersuchen zu können.

Die Auswahl der zu untersuchenden Stoffe richtete sich nach verschiedenen Kriterien. Zum einen sollten in der Literatur ihre Wirkmechanismen zumindest für den Säuger gut beschrieben sein, wobei sowohl Substanzen ähnlicher als auch unähnlicher Wirkmechanismen ausgewählt wurden. Zum anderen sollten sie eine gewisse Umweltrelevanz besitzen, d.h. sie sollten entweder auf der Prioritätenliste des österreichischen Umweltbundesamt vertreten (Sattelberger, 1999)<sup>3</sup> oder in Umweltproben nachgewiesen worden sein.

Für die Untersuchung der Kombinationswirkung der getesteten Substanzen wurden Vorhersagen nach den beiden Konzepten Konzentrationsadditivität und Unabhängiger Wirkung auf Basis der Toxizitätsdaten der Einzelstoffe kalkuliert und mit den experimentell ermittelten Daten verglichen. Es wurden Mischungen aus Substanzen ähnlicher wie auch unähnlicher Wirkmechanismen untersucht. Als Toxizitätsparameter dienten zum einen die vier, nach Schulte und Nagel (1994)<sup>2</sup>, als letal definierten Endpunkte, d.h. fehlende Anlage der Somiten, fehlende Schwanzablösung vom Dotter, fehlender Herzschlag sowie die Koagulation der Embryonen. Zum anderen wurden nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet.

Für die Versuche auf Basis sublethaler Effekte wurden „reduzierte oder fehlende Pigmentierung“, „fehlender Blutkreislauf“ sowie „Deformationen“ als Bezugspunkte gewählt.

Die Modellierung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen erfolgte durch fallweise Auswahl des „best fitting“-Modells der drei, in der Ökotoxikologie gebräuchlichen Standardmodelle Probit, Logit und Weibull.

## 3. Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Einzelstoffe konnte das in der Literatur beschriebene teratogene Potential von ASS, Diclofenac und Valproinsäure bestätigt werden. Es konnte ebenfalls die dämpfende Wirkung der  $\beta$ -Blocker auf die Herzschlagfrequenz gezeigt werden. Von den

---

<sup>1</sup> NAGEL, R., 1998, OECD Guideline für Testing of Chemicals, Fish Embryo Toxicity Test With The Zebrafish *Danio rerio*, Draft

<sup>2</sup> SCHULTE, C.; NAGEL, R.: 1994; Testing Acute Toxicity in the Embryo of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an Alternative to the Acute Fish Test: Preliminary Results, ATLA (Alternatives to Laboratory Animals) 22, 12- 19

<sup>3</sup> SATTELBERGER, R., 1999, Arzneimittelrückstände in der Umwelt. Bestandsaufnahme und Problemdarstellung, Report R-162, Umweltbundesamt Österreich, <http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/R162.pdf>

untersuchten Substanzen war 17- $\alpha$ -Ethinylöstradiol war am toxischsten für die exponierten Embryonen. Als am wenigsten toxisch erwies sich Terbutalin.

In allen untersuchten Mischungen zeigten sich Effekte in Konzentrationen, die allein appliziert keinen oder nur einen geringen Effekt hervorrufen würden. Anhand von Vorversuchen mit der Substanzklasse der Analgetika zeigte sich eine Beeinflussung der Ergebnisse von Kombinationsexperimenten durch die Auswahl des Endpunktes. In beiden untersuchten Ansätzen zeigte sich eine weniger als additive Mischungstoxizität, wenn alle vier als letal definierten Endpunkte zur Berechnung der LC<sub>50</sub>(48h) herangezogen wurden. Wurde die LC<sub>50</sub>(48h) hingegen ausschließlich unter Berücksichtigung der koagulierten Embryonen berechnet, zeigte sich eine mehr als additive Mischungstoxizität. Für alle weiteren Untersuchungen (Einzelstoff- und Mischungsexperimente) wurden daher nur die koagulierten Embryonen als letal gewertet und die LC<sub>x</sub>-Werte entsprechend berechnet.

Die Toxizität aller Mischungen, d.h. sowohl die Toxizität für Mischungen aus Substanzen ähnlicher als auch die Toxizität für Mischungen aus Substanzen unähnlicher Wirkmechanismen, wurde sehr gut durch das Modell der Konzentrationsadditivität beschrieben, wohingegen das Modell der Unabhängigen Wirkung die Toxizität der Mischungen in der Regel unterschätzte.

In den drei Mischungen auf Basis der NOEC-Werte der Einzelstoffe koagulierten alle eingesetzten Embryonen innerhalb von 12 Stunden nach Expositionsbeginn. Es zeigte sich, dass auch geringe Konzentrationen von Einzelstoffen, die allein appliziert mehr oder weniger keinen Effekt hervorrufen würden, zu einer deutlichen Mischungstoxizität führen können. Dies gilt sowohl für Mischungen partiell ähnlich wirkender als auch für Mischungen unähnlich wirkender Stoffe. In den drei untersuchten Ansätzen lagen sämtliche Mischungskomponenten in Konzentrationen vor, die nach statistischer Schätzung allein jeweils Effekte unter 1% auslösen würden. Es resultierte jedoch in allen drei Proben jeweils ein Gesamteffekt der Testgemische von 100% daraus.

Die Vorversuche auf Basis subletaler Effekte lieferten keine mit den beiden Vorhersagekonzepten auswertbaren Ergebnisse, so dass hier weiterer Forschungsbedarf besteht.

#### **4. Fazit**

Die Ergebnisse zeigen, dass der Embryotest für die Untersuchung von Pharmaka als Einzelstoffe geeignet ist und auch für die Untersuchung der Kombinationswirkung von Pharmaka ein geeignetes Modell darstellt.

Bei der Untersuchung der Mischung zeigte sich unabhängig davon ob die Mischungskomponenten unähnliche oder ähnliche Wirkmechanismen hatten, immer eine additive Mischungstoxizität. Die eingesetzten Konzentrationen der einzelnen Mischungskomponenten lagen z.T. deutlich unterhalb der NOEC. Da auch in diesen Konzentrationen Effekte auftraten, ist die NOEC kritisch zu hinterfragen.

Ausgangsbasis für die Annahme ähnlicher bzw. unähnlicher Wirkmechanismen waren Literaturdaten aus Untersuchungen an Säugern. Es ist jedoch unklar, ob die getesteten Substanzen im Fisch denselben Wirkmechanismus aufweisen, auch wenn die entsprechenden Target-Moleküle, wie z.B. die COX-Enzyme oder  $\beta$ -Rezeptoren in Fischen nachgewiesen

wurden. Es ist weiterhin unklar, ob die diese Target-Moleküle im Fisch dieselbe Funktion erfüllen und ab welchem Zeitpunkt sie in der Embryonalentwicklung vorhanden sind. Direkte Rückschlüsse von den pharmakologischen Wirkungen bei Säugern auf andere Tiergruppen wie z.B. Fische, sind daher schwierig.

Nichtsdestotrotz haben die Untersuchungen zur Kombinationswirkung der untersuchten Substanzen gezeigt, dass Effekte noch im Bereich der NOEC und auch darunter zu beobachten sind, unabhängig von der Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit der Wirkmechanismen im Säuger. Die Mischungstoxizität sollte also unbedingt im Rahmen der Risikobewertung Berücksichtigung finden. Da das Konzept der Unabhängigen Wirkung die Toxizität der Gemische in aller Regel unterschätzte, sollte basierend auf dem Vorsorgeprinzip das Konzept der Konzentrationsadditivität im Rahmen der regulatorischen Mischungsbewertung Anwendung finden.

### **Erläuterung des Bezugs der Arbeit zu den Themen des PGS**

Die Dissertation befasst sich mit der Testung von Chemikalien einzeln und in Kombination in einem aquatischen Biotest. Der Fischembryotest ist mittlerweile als OECD-Testguideline validiert (OECD 236) und soll als Alternative zum akuten Fischttest nach OECD 203 Anwendung finden. Die Arbeit hat damit einen klaren Bezug zu den Themen „aquatische Ökotoxikologie“ und „Anwendung von Alternativmethoden“ des PGS. Die Mischungsbewertung ist zudem ein wichtiges Thema in der regulatorischen Ökotoxikologie. So schreiben mittlerweile u.a. die Pflanzenschutzmittel- und die Biozid-Verordnung eine Bewertung der Mischungstoxizität der entsprechenden Produkte verbindlich vor.

### **Beschreibung des Eigenanteils an den durchgeführten Arbeiten**

Sämtliche in der Arbeit aufgeführten Untersuchungen wurden von mir durchgeführt. Fachliche Unterstützung hatte ich bei der Erstellung der Graphen zur Darstellung der Ergebnisse der Kombinationsexperimente mit der Software R durch Dirk Jungmann (TU Dresden).

### **Publikationsliste**

#### **Diplomarbeit**

- Kehrer, A., 2004, „Die Wirkung von Gemischen auf die Embryonalentwicklung des Zebraäbrblings (*Danio rerio*)“, Diplomarbeit, TU Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Institut für Hydrobiologie

#### **Dissertation**

- Kehrer, A., 2008, „Der Embryotest mit dem Zebraäbrbling als Modell für die Untersuchung der Kombinationswirkung von Chemikalien“, Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften, Institut für Hydrobiologie,  
[http://www.qucosa.de/fileadmin/data/qucosa/documents/2552/Arbeit\\_komplett.pdf](http://www.qucosa.de/fileadmin/data/qucosa/documents/2552/Arbeit_komplett.pdf)

#### **Publikationen**

- Kehrer, A., Wieck, S., 2011, What UBA is doing at the NSBWO, The Ballast Water Times, Volume 1, 2011/2012, p. 5
- Wieck, S., Kehrer, A., Schwarz-Schulz, B., 2012, Determining the Environmental Risk-Proposal for an Emission Scenario document (ESD) on Ballast Water Discharge based on MAMPEC and the Consequences for the Risk Assessment, in Werschkun, B., Höfer, T., Greiner, M., Emerging Risks from Ballast Water Treatment, BfR Wissenschaft, <https://www.bfr.bund.de/cm/350/emerging-risks-from-ballast-water-treatment.pdf>.
- Coors, A., Dobrick, J., Möder, M., Kehrer, A., 2012, Mixture toxicity of wood preservative products in the fish embryo toxicity test, Environmental Toxicology and Chemistry, DOI 10.1002/etc.1827
- OECD, 2012, OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, No. 150, GUIDANCE DOCUMENT ON STANDARDISED TEST GUIDELINES FOR EVALUATING CHEMICALS FOR ENDOCRINE DISRUPTION (Satya et al., 2012)
- Frische, T., Bachmann, J., Frein, D., Juffernholz, T., Kehrer, A., Klein, A., Maack, G., Stock, F., Stolzenberg, H.-C., Thierbach, C., Walter-Rohde, S., 2013, Identification, Assessment and Management of „endocrine disruptors“ in wildlife in the EU substance legislation- Discussion Paper from the German Federal Environment Agency (UBA), Toxicology Letters 223, 306-309
- Backhaus, T., Altenburger, R., Faust, M., Frische, T., Frein, D., Johansson, P., Kehrer, A., Porsbring, T., 2013, Proposal for environmental mixture toxicity assessment in the context of the biocidal product authorization in the EU, Environmental Science Europe, 25:4,, <http://www.enveurope.com/content/25/1/4>
- Coors, A., Weisbrod, B., Schoknecht, U., Sacher, F., Kehrer, A., 2014, Predicting acute and chronic effects of wood preservative products in *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata* based on the concept of Concentration addition, Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 33, no. 2, pp. 382-393
- Werschkun, B., Banerji, S., Bazurko, O., C., Fuhr, F., Gollasch, S., Grummt, T., Haarich, M., Jha, A., N., Kacan, S., Linders, J., Pughiuc, D., Richardson, S., D., Theobald, N., von Gunten, U., Wieck, S., David, M., Kehrer, A., Mesbahi, E., Schwarz-Schulz, B., Höfer, T., 2014, Emerging risks form ballast water treatment: A survey in the run-up to the International Ballast Water Management Convention, Chemosphere, Vol. 112, p. 256-266
- Rauert, C. Böhnhardt, A., Dusquesne, S., Friesen, A., Hermann, G., Hufenbach, C., Jöhncke, U., Kehrer, A., Neumann, M., Prutz, I., Schönfeld, J., Wiemann, A., Willhaus, K., 2014, Proposal for a harmonised identification and assessment of PBT-/vPvB-substances across different regulatory frameworks, Environmental Science Europe, 26:9, <https://doi.org/10.1186/2190-4715-26-9>
- Coors, A., Vollmar, P., Sacher, F., Kehrer, A., 2018, Is there synergistic interaction between fungicides inhibiting different enzymes in the ergosterol biosynthesis pathway in toxicity tests with the green alga *Raphidocelis subcapitata*?, Ecotoxicology, 27: 936-944
- Coors, a., Vollmar, P., Heim, J., Sacher, F., Kehrer, A., 2018, Environmental risk assessment of biocidal products: identification of relevant components and reliability of a component-based mixture assessment, Environmental Science Europe, 30:3
- Guimarares, B., Bandow, C., Amorim, M., J., B., Kehrer, A., Coors, A., 2018, Mixture toxicity assessment of a biocidal product based on reproduction and avoidance behaviour of the collembolan *Folsomia candida*, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 165, p. 284-290

Im Rahmen der Diplomarbeit „Die Wirkung von Gemischen auf die Embryonalentwicklung des Zebrafisches (*Danio rerio*)“ wurde der Fischembryotest mit dem Zebrafisch erstmalig auf seine Anwendbarkeit zur Vorhersage von Kombinationswirkungen untersucht. Es wurden eine Reihe von Einzelstoff- und Mischungsexperimenten durchgeführt. Para-tert-Butylphenol, Hydrochinon, Isoprenalin, Hydroxyharnstoff, und Vitamin-A-Säure sowie 3,4-Dichloranilin und Cadmiumchlorid wurden einzeln sowie in unterschiedlichen Kombinationen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Embryotest als Modell für Kombinationsexperimente geeignet ist. Neben antagonistischen Effekten konnten auch additive bzw. synergistische Effekte beobachtet werden. Die beobachteten letalen und subletalen Effekte aus den Einzelsubstanzversuchen fanden sich auch in den Mischungen. Die durchgeführten Experimente waren wichtige Vorarbeiten für die vorgelegte Dissertation.