

Kombinationswirkungen hormonartig wirkender Chemikalien

von

Gerhard Eisenbrand, Bernd Mußler (Universität Kaiserslautern)

und Gisela H. Degen (*IfADo*)

Zusammenfassung

Belastungen des Menschen durch östrogenartig wirkende synthetische Stoffe müssen vor dem Hintergrund der physiologischen Variation endogener (körpereigener) Hormonspiegel und der unvermeidlichen Aufnahme an Phytoöstrogenen mit der Nahrung gesehen werden. Ein für die Bewertung wichtiger Aspekt ist daher auch die Aufklärung von Kombinationseffekten beim Zusammenwirken von Östrogenen synthetischen und natürlichen Ursprungs.

Für experimentelle Untersuchungen *in vitro* wurden transgene Säugerzellen herangezogen, die den für hormonelle Effekte maßgeblichen Östrogenrezeptor und ein sogenanntes Reportergen enthalten. Mit Hilfe dieses Systems (Reportergen-Assay) können Wirkungen östrogenen Stoffe auch in größeren Versuchsreihen noch mit vertretbarem Aufwand quantifiziert werden. Für repräsentative Industriechemikalien (Bisphenol A, *p*-tert-Octylphenol, Nonylphenol, *o,p'*-DDT), das Phytoöstrogen Daidzein und das natürliche Hormon Estradiol sind Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt und binäre Gemische dieser Stoffe untersucht worden.

Aus Kombinationsversuchen, die bei einer relativ hohen Konzentration an Estradiol (1 nM) mit verschiedenen Xenoöstrogen-Konzentrationen durchgeführt wurden, ergaben sich Anhaltspunkte für überadditive Effekte. In Anbetracht der steilen Dosis-

Wirkungs-Beziehung für Estradiol und seiner - im Vergleich zu endogenen Hormonspiegeln - hohen Konzentration im Reporterassay ist die Relevanz dieser Beobachtung und ihre Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation allerdings fraglich. Befunde von Experimenten, in denen eine niedrigere, eher physiologische Estradiolkonzentration (0,1 nM) und verschiedene Konzentrationen an Fremdstoff kombiniert wurden, werden daher als wichtiger erachtet: sie zeigen rein additive Wirkungen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bei den Kombinationsversuchen *in vitro* bisher keine Ergebnisse erhalten wurden, die der Annahme einer additiven Wirkung bei Kombination von endogenen und exogenen Östrogenen widersprechen. Dies ist ein wesentlicher Befund für die Bewertung und eine wichtige Basis für geplante *in vivo*-Untersuchungen mit exemplarischen Kombinationen.

1 Einleitung

Erkenntnisse über die schädigenden Wirkungen diverser Einzelexpositionen auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit haben zur Festsetzung von Umweltstandards geführt (Akademie der Wissenschaften zu Berlin 1992; Sachverständigenrat für Umweltfragen 1994). Kombinationswirkungen wurden dabei praktisch nicht berücksichtigt.

Die Brisanz des Themas wurde anhand eines spektakulären Beispiels angeblich hochgradig synergistischer Wirkung zweier einzeln nur sehr schwach östrogen wirksamer Stoffe offenkundig: Im Juni 1996 erschien in *Science* eine entsprechende Veröffentlichung (Arnold et al. 1996).

Hormonartige Wirkungen bzw. Wirkungen von Chemikalien auf das endokrine System waren bereits zuvor unter dem neuen Stichwort "endokrine Disruption" diskutiert worden (Colburn 1995; Colborn et al. 1996). Die Möglichkeit aber, dass die Wirkung solcher Stoffe in Kombination um ein Vielfaches gesteigert werden könnte, initiierte heftigste Diskussionen über die Zweckmäßigkeit regulatorischer Maßnahmen zur Begrenzung der Konzentrationen von Stoffen in den verschiedenen Umweltmedien mit dem Ziel, Schadwirkungen zu begrenzen, weil diese Werte gemeinhin auf der Basis von Untersuchungen einzelner Stoffe festgelegt werden.

Die erwähnten und hochrangig publizierten Ergebnisse konnten jedoch von anderen Wissenschaftlern (Ashby et al. 1997; Gaido et al. 1997; Raamamoorthy et al. 1997a, b) und schließlich auch von den Autoren selbst nicht reproduziert werden, die daraufhin die Veröffentlichung zurückzogen (McLachlan 1997). Dieses Beispiel zeigt nicht nur die sehr negativen Auswirkungen einer derzeit in den Biowissenschaften grassierenden Jagd nach kurzfristigem Publikationserfolg im Hinblick auf die sog. "Impact-Faktoren", sondern illustriert auch die Dringlichkeit, mit der die bestehenden Probleme der Grenzwertsetzung bei kombinierten Expositionen gegenüber hormonartig wirkenden Stoffen gelöst werden sollten.

Auf diesem Hintergrund wird in den Jahren 1998-2000 seitens des Umweltbundesamtes (UBA) ein multizentrisches Forschungsprojekt zu Kombinationswirkungen östrogenartig wirkender Chemikalien gefördert, in dem das *IfADo* mit Gruppen der Universität Kaiserslautern, der TU Dresden und der Deutschen Sporthochschule Köln zu-

sammengeschlossen ist. Die hier vorgelegten Zwischenergebnisse wurden seitens des Verbundprojektes zum Jahresende 1999 für das Umweltbundesamt dokumentiert. Der Schwerpunkt der experimentellen Arbeiten lag dabei auf der Prüfung möglicher Kombinationswirkungen von ausgewählten Fremdstoffen *in vitro* vor dem Hintergrund physiologischer Estradiolkonzentrationen.

Bei den ausgewählten Stoffen handelt es sich um das Phytoöstrogen Daidzein, das vor allem in Soja vorkommt sowie die Industriechemikalien Bisphenol A, *p*-tert-Octylphenol, Nonylphenol und *o,p'*-DDT. Diese Stoffe binden nur mit sehr geringer Affinität an den Östrogenrezeptor und haben *in vitro* ein deutlich geringeres östrogenes Potential als das natürliche Steroidhormon Estradiol (Gaido et al. 1997; Hopert et al. 1998; Kuiper et al. 1998). Sie zeigen daher erst in erheblich höheren Dosierungen bzw. Konzentrationen als Estradiol (E₂) eine hormonelle Wirkung (Übersicht: Bolt & Degen 2000; Degen & Bolt 2000; Mäkelä et al. 1999).

Generell kann aus der Interaktion mit dem Östrogenrezeptor (ER bzw. den Subtypen ER-alpha und ER-beta) eine *agonistische* Wirkung (Aktivierung ER-regulierter Gene), aber auch eine antiöstrogene, also *antagonistische* Wirkung resultieren (Diel et al. 1999; Saunders 1998). Eine Wirkungsminde- rung wäre u. U. auch zu erwarten, wenn schwache "Xenoöstrogene" (Fremdstoffe mit östrogenartiger Wirkung) den natürlichen Liganden Estradiol vom Rezeptor verdrängen. Der skizzierte Wirkungsmechanismus lässt für Gemische vor allem folgende Arten von Kombinationseffekten erwarten, nämlich synergistische Wirkungen oder antagonistische Wirkungen; desweiteren sind überadditive (potenzierende) Wirkungen oder der in der Pharmakologie häufige Fall denkbar, dass bei der Gesamtwirkung nur der Effekt einer Substanz zum Tragen kommt (Griefahn et al. 2000).

2 Methodik

Reporter- bzw. Transaktivierungsassays werden primär zur Bestimmung des östrogenen Potenzials von Prüfsubstanzen eingesetzt; ein solches Testsystem ist in Gegenwart von Estradiol aber auch geeignet, ein antiöstrogenes Potential von Stoffen aufzudecken (Diel et al. 1999).

Es wurden stabil mit einem Reporter-gen-system transfizierte humane Brustkrebszellen (s. u.) mit Kombinationen von Estradiol (1 nM bzw. 0,1 nM) und Fremdstoffen in Konzentrationen von 1 nM bis 1 µM inkubiert. Die Reporter-gen-induktion korreliert direkt mit dem hormonellen Potenzial der Substanzkombinationen. Im gleichen Expe-

riment wurden jeweils eine Estradiolstandardkurve sowie die Konzentrations-Wirkungskurven (1-1000 nM) der jeweiligen Einzelstoffe mitgeführt.

2.1 Reporter-gen-assay

Das *in vitro*-Testsystem erlaubt anhand der Ligand-Rezeptor-DNA-Interaktion, die die Transkription und Translation des Reporters zur Folge hat, einen funktionellen, spezifischen und sensitiven Prüfansatz (vgl. Abb. 1). Da ein Mikrotiterplattenlumino-meter zur Verfügung steht, kann mit stabil transfizierten reporter-gen-exprimierenden Zellen ein schneller Probendurchsatz erreicht werden.

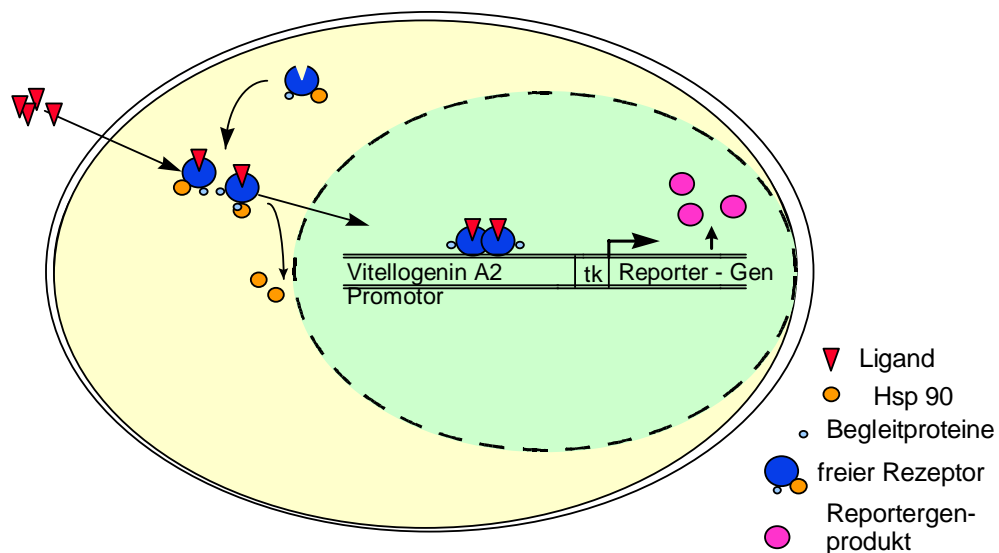
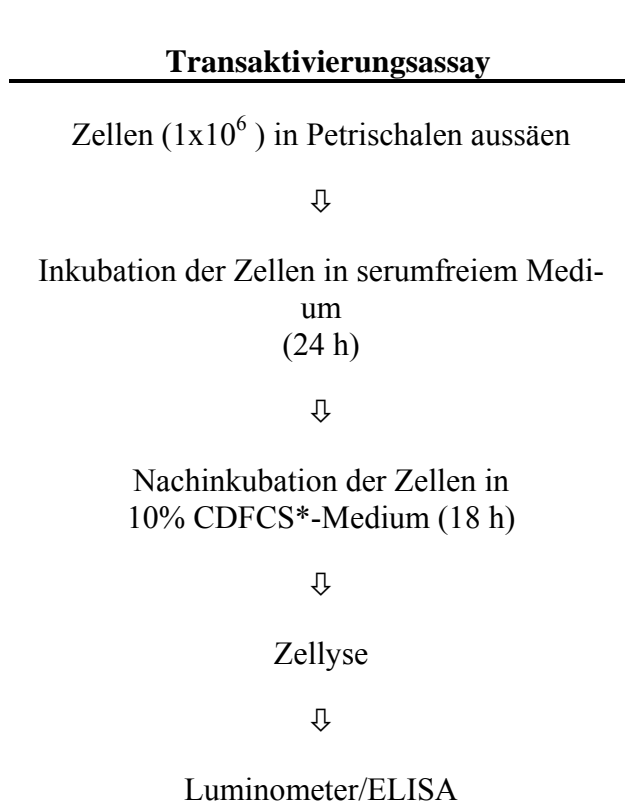


Abb. 1: Schematische Darstellung des verwendeten zellulären Systems zur Prüfung estrogen aktiver Verbindungen

2.1.1 Versuchsdurchführung:



*CDFCS: Mit Aktivkohle behandeltes Kälberserum, das weitgehend frei von endogenen Hormonen ist

3 Ergebnisse

Für die Bestimmung des hormonellen Potenzials von Kombinationen zwischen dem endogenen Hormon und östrogenartigen Substanzen wurden stabil transfizierte humane Mammakarzinomzellen MCF-7-VITA2-Luciferase (auch MVLN-Zellen) herangezogen (Mußler & Eisenbrand 1995). Diese Zelllinie wird von dem Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) der US-EPA als best geeignetes und valides Testsystem für *in vitro*-Prüfungen von „endokrinen Disruptoren“ ausdrücklich empfohlen. Dieses Testsystem erlaubt neben der exakten Bestimmung des Reportergens eine sehr effiziente Testdurchführung. Mit keinem anderen der von uns auch eingesetzten Testsysteme ist ein vergleichbar hoher Probendurchsatz erreichbar. Insbesondere der sogenannte E-Screen-Assay erfordert einen höheren Arbeitsaufwand und liefert kein verlässliches

Ergebnis der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, da weitere Signaltransduktionswege durch Estradiol und/oder Fremdstoff beeinflusst werden können.

In den Experimenten wurden verschiedene Konzentrationen an Xenoöstrogen mit zwei unterschiedlich hohen Konzentrationen an Estradiol kombiniert. Diese Versuche wurden in zwei großen Blöcken durchgeführt: bei der höheren Estradiolkonzentration (1 nM) ist das Reporter gen bereits durch die eine Komponente deutlich aktiviert, so dass außer additiven auch antagonistische Effekte der zweiten Komponente aufgedeckt werden können. Die eher physiologische, niedrigere Estradiolkonzentration (0,1 nM) diente primär dazu, synergistische Kombinationswirkungen aufzudecken.

3.1 Kombinationsexperimente *in vitro*: Fremdstoffe (1 nM-1 µM) bei einer 1 nM-Konzentration Estradiol

Die in den Abb. 2 - 6 dargestellten Einzelergebnisse repräsentieren jeweils mindestens 4 unabhängige Einzelmessungen. Die hier und im Folgenden dargestellten Ergebnisse resultieren aus vielen hundert Einzelmessungen, da jeweils die Bestimmung der Reporter geninduktion durch Estradiol als Bezugsgröße durchgeführt wurde und auch Negativkontrollen mitbestimmt werden mussten. Bei der Bestimmung der Kombinationswirkungen sind oft deutlich größere Schwankungsbreiten zu beobachten als in den Einzelexperimenten. Die Ergebnisse werden im Folgenden einheitlich dargestellt:

Die schwarzen Balken (1-5) repräsentieren die Reporter geninduktion, die durch den physiologischen Liganden Estradiol über einen Konzentrationsbereich von 0,01 nM - 100 nM erzielt wird. Dies gilt für die Abbildungen 2 - 11.

Die weißen Balken (10-13) repräsentieren jeweils die Reporter geninduktion durch die Einzelstoffe. Dies gilt ebenfalls für die Abbildungen 2 - 11.

Die grauen Balken (6-9) ergaben sich aus

der Kombination des physiologischen Liganden Estradiol (1 nM) mit dem jeweiligen Fremdstoff in zunehmender Konzentration

(1-1000 nM).

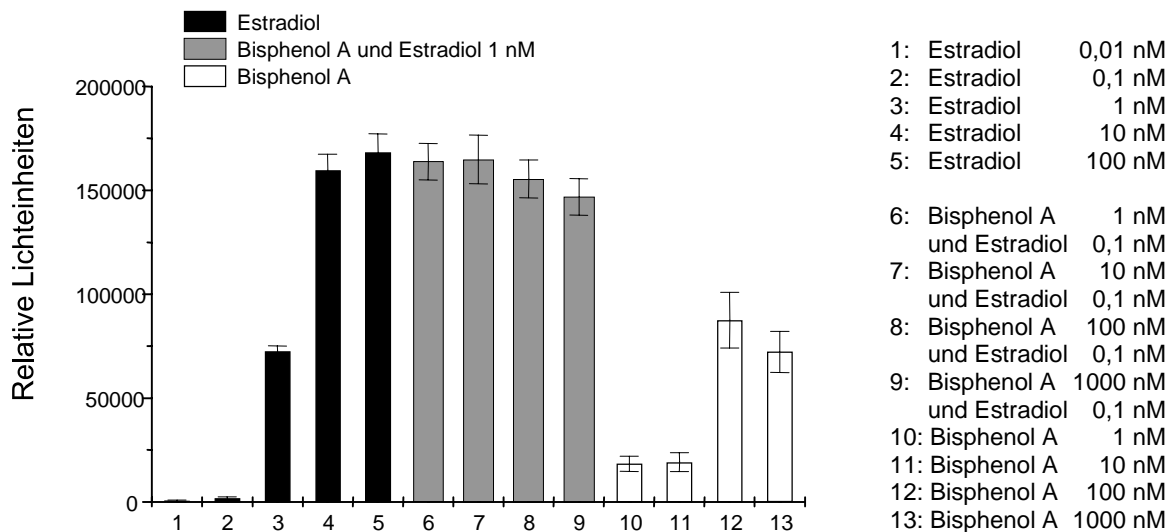


Abb. 2: Reporterageninduktion durch Estradiol, Bisphenol A und Kombinationen von E₂ (1 nM) mit zunehmenden Bisphenol A-Konzentrationen (1-1000 nM)

Die in Abb. 2 dargestellten Ergebnisse der Kombination von Estradiol und Bisphenol A erreichen durchweg das Sättigungsplateau, das auch durch unphysiologisch hohe Estradiolkonzentrationen erreicht wird. Die Kombination von Estradiol und Bisphenol A ruft vor allem bei niedrigen Bisphenol A-Konzentrationen (1-10 nM) scheinbar überadditive Effekte hervor, die jedoch nie das Wirkplateau hoher Estradiolkonzentrationen überschreiten. Inwieweit diese Messergebnisse tatsächlich überadditive Wirkungen der Fremdstoffe wiedergeben, konnte nicht abschließend ermittelt werden. Detailliertere Untersuchungen, insbesondere in dem sehr steil verlaufenden Dosis-Wirkungs-Kurvenabschnitt um den EC₅₀-Wert von Estradiol, könnten hier eventuell zur weiteren Klärung beitragen.

Die in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse der Kombination von Estradiol und *o,p'*-DDT erreichen das Sättigungsplateau bei 10 nM *o,p'*-DDT. Die im Falle von Balken 8 und 9 beobachtbare Abnahme des Reportergensignals könnte auf partiell antagonistische Wirkungen hoher *o,p'*-DDT-Konzentrationen zurückzuführen sein.

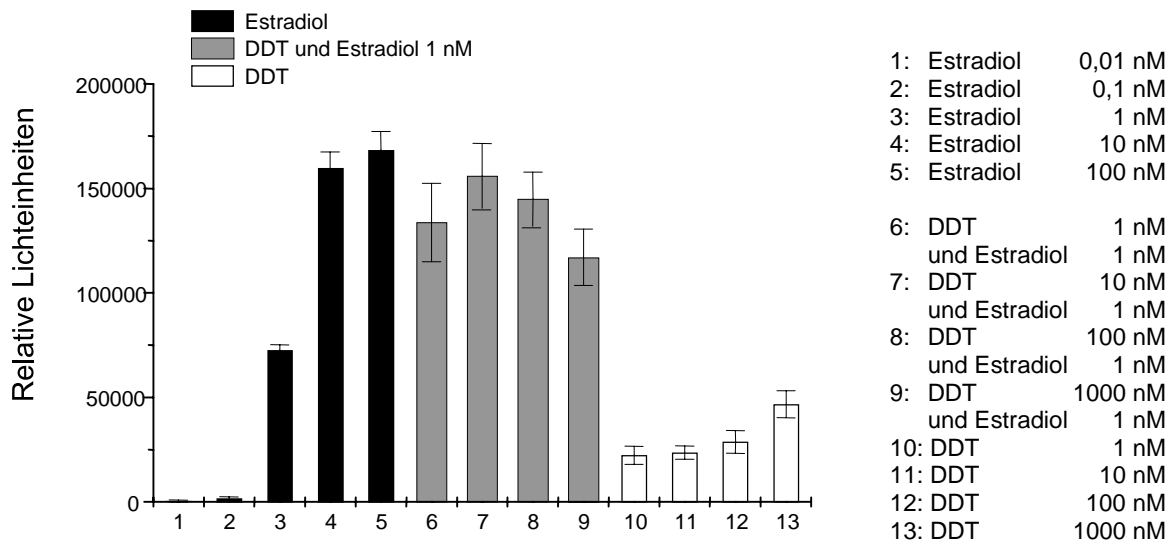


Abb. 3: Reporterageninduktion durch Estradiol, *o,p'*-DDT und Kombinationen von E₂ (1 nM) mit zunehmenden *o,p'*-DDT Konzentrationen (1 - 1000 nM)

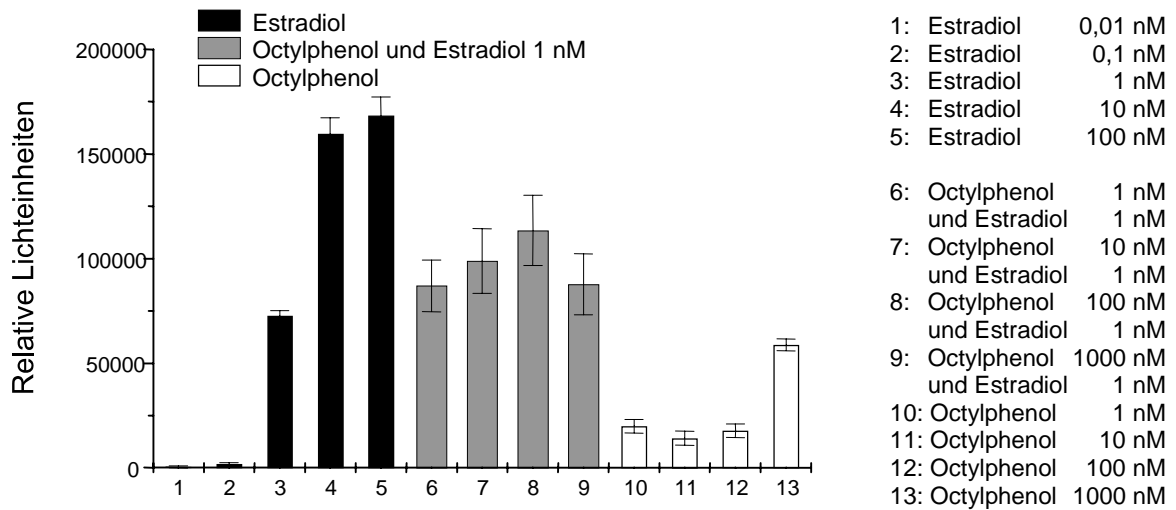


Abb. 4: Reporterageninduktion durch Estradiol, *p-tert*-Octylphenol und Kombinationen von E₂ (1 nM) mit zunehmenden *p-tert*-Octylphenol-Konzentrationen (1-1000 nM)

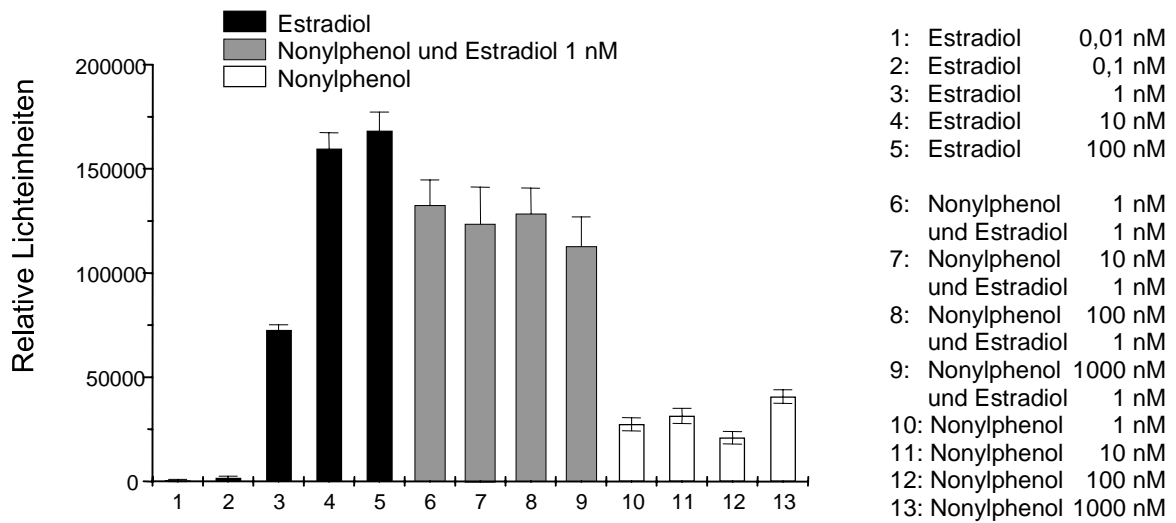


Abb. 5: Reportergergeninduktion durch Estradiol, Nonylphenol (techn.) und Kombinationen von E₂ (1 nM) mit zunehmenden Nonylphenol (techn.) Konzentrationen (1-1000 nM)

Isomerenreines *p-tert*-Octylphenol und Nonylphenol (techn.) induzieren in Kombination mit Estradiol ebenfalls eine additive Reportergerantwort. Die erhaltenen Werte aus den Kombinationsversuchen werden durch die zytotoxischen Wirkungen der Alkylphenolderivate beeinflusst.

Insbesondere bei hohen Nonylphenol- und Octylphenolkonzentrationen überlagern sich möglicherweise gemischt agonistische/antagonistische Wirkungen der Verbindungen mit toxischen Nebeneffekten, die einen Einfluss auf die Reportergerstimulation haben können.

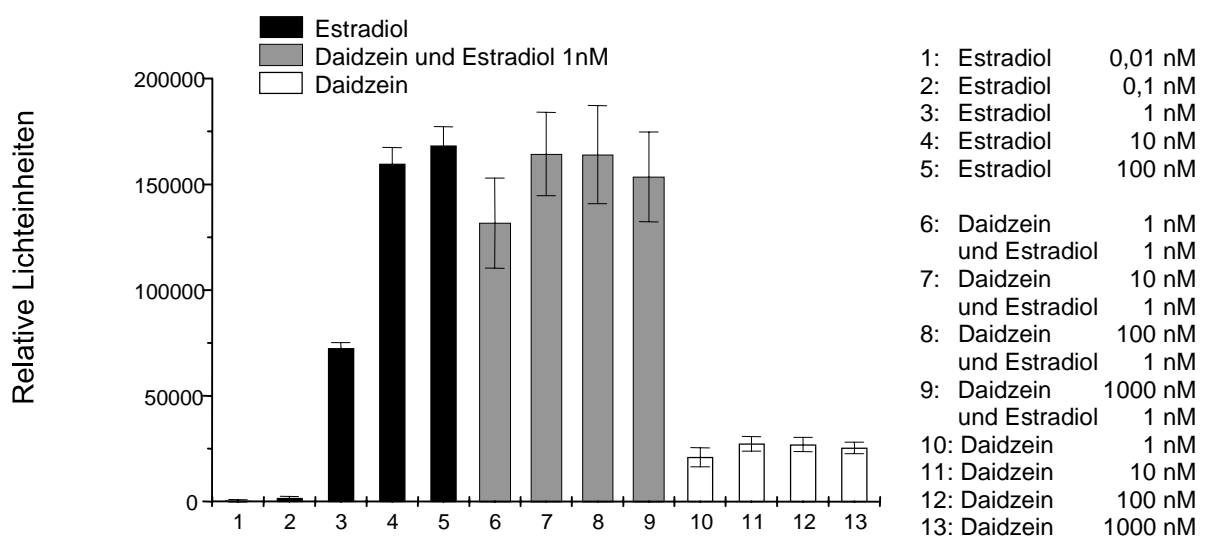


Abb. 6: Reportergergeninduktion durch Estradiol, Daidzein und Kombinationen von E₂ (1 nM) und zunehmenden Daidzein-Konzentrationen (1-1000 nM)

Daidzein, das als Einzelverbindung in den gewählten Konzentrationen eine relativ schwache estrogene Aktivität aufweist, induziert in den Kombinationsexperimenten die Reportergeninduktion bis in das maximale Wirkplateau unphysiologischer Estradiolkonzentrationen.

In allen durchgeführten Kombinationsexperimenten ergaben sich *additive Effekte* aus der Kombination Estradiol und Fremdstoff. Dagegen konnten *keine signifikanten überadditiven* („potenzierenden“) *Wirkungen* von Kombinationen mit Fremdstoff innerhalb der Testreihe beobachtet werden. Additive Wirkungen führten höchstens bis zum maximalen Wirkplateau, das auch durch unphysiologische Estradiolkonzentrationen erreicht werden kann. Im Falle der höchsten Fremdstoffkonzentrationen können partiell antagonistische Wirkungen der Fremdstoffe auftreten.

Die durchgeführten Untersuchungen wurden nach Beratung von Seiten der Projektgruppe durch exemplarisch durchgeführte Experimente zur Hemmbarkeit der Transaktivierung vervollständigt. Hierbei wurde

durch die zusätzliche Gabe eines Östrogenrezeptor-Antagonisten (z.B. ICI 182 780) das Reportergerensignal aus der Kombination Fremdstoff und Estradiol vollständig unterdrückt. Der Übersicht halber sind diese (für verschiedene Kombinationen plus 1 μM ICI 182 780) einheitlichen Ergebnisse nicht grafisch dargestellt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Ergebnissen aus Experimenten mit Einzelstoffen, in denen das komplette Antiestrogen ICI 182 780 ab einer Konzentration von 1 μM die Reportergeninduktion durch potente Agonisten praktisch vollständig hemmt.

3.2 Kombinationsexperimente: Fremdstoffe (1 nM–1 μM) bei einer 0,1 nM-Konzentration an Estradiol

Die Diskussion der oben dargestellten Ergebnisse innerhalb der Projektgruppe führte dazu, zusätzliche Experimente bei einer Estradiolkonzentration durchzuführen, die zu einer Reportergeninduktion knapp oberhalb der Signifikanzschwelle führt. Für diese Experimente wurde eine Konzentration von 0,1 nM Estradiol gewählt.

Reportergenassay: Kombination von Bisphenol A und 0,1 nM Estradiol

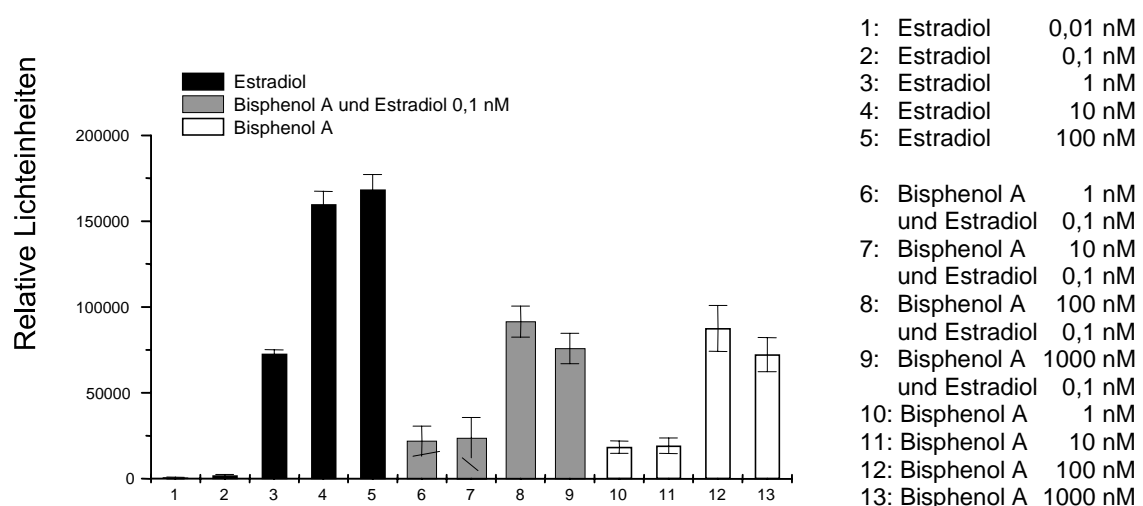


Abb. 7: Reportergeninduktion durch Estradiol, Bisphenol A und Kombinationen von E₂ (0,1 nM) und zunehmenden Bisphenol A Konzentrationen (1-1000 nM)

Reportergenassay: Kombination von DDT und 0,1 nM Estradiol

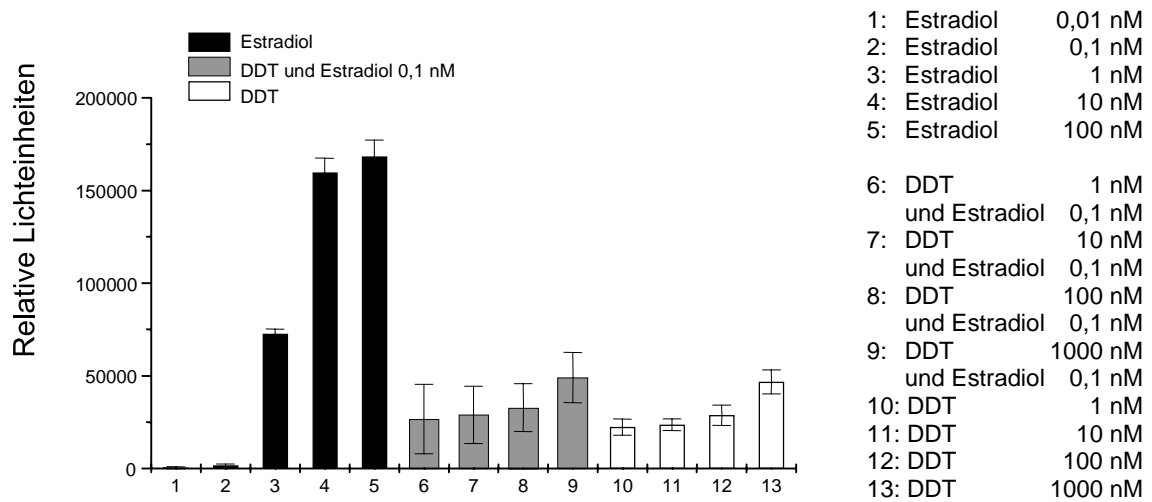


Abb. 8: Reportergeninduktion durch Estradiol, *o,p'*-DDT und Kombinationen von E₂ (0,1 nM) und zunehmenden *o,p'*-DDT-Konzentrationen (1-1000 nM)

Reportergenassay : Kombination von Octylphenol und Estradiol

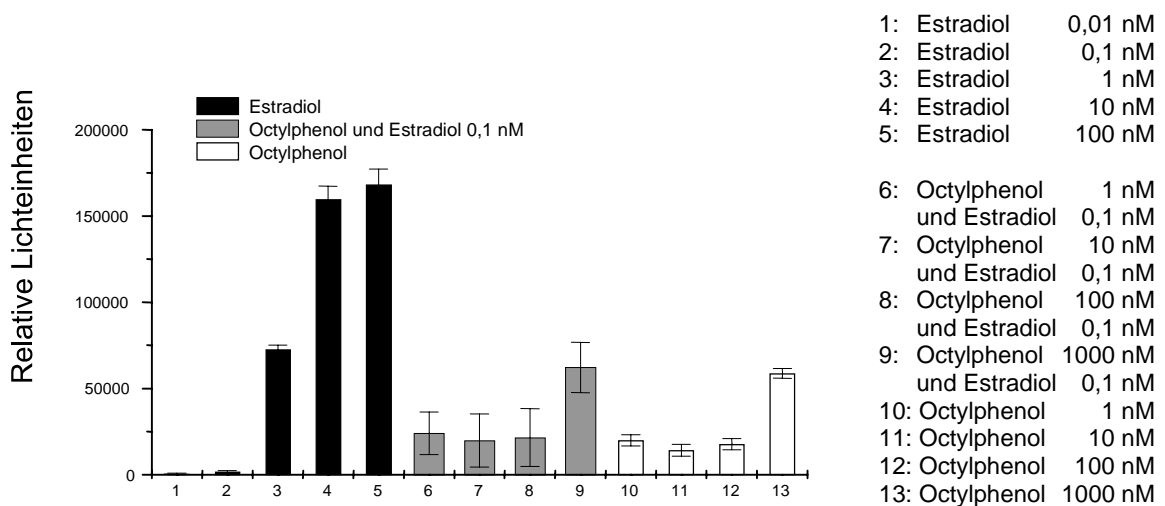


Abb. 9: Reportergeninduktion durch Estradiol, *p-tert*-Octylphenol und Kombinationen von E₂ (0,1 nM) und zunehmenden *p-tert*-Octylphenol-Konzentrationen (1-1000 nM)

Reporterassay: Kombination von Nonylphenol und 0,1 nM Estradiol

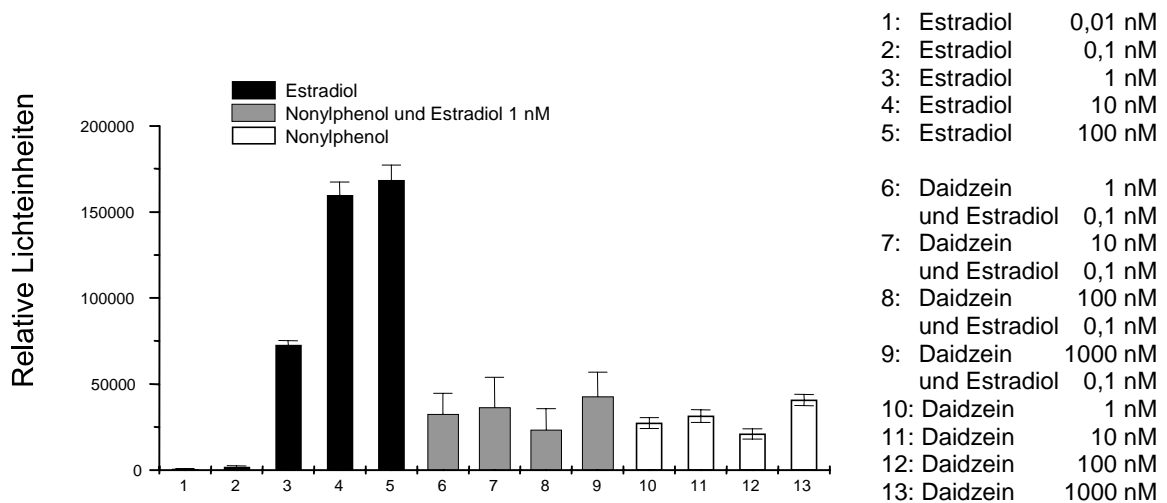


Abb. 10: Reporterinduktion durch Estradiol, Nonylphenol (techn.) und Kombinationen von E₂ (0,1 nM) und zunehmenden Nonylphenol-Konzentrationen (1-1000 nM)

Reporterassay: Kombination von Daidzein und 0,1 nM Estradiol

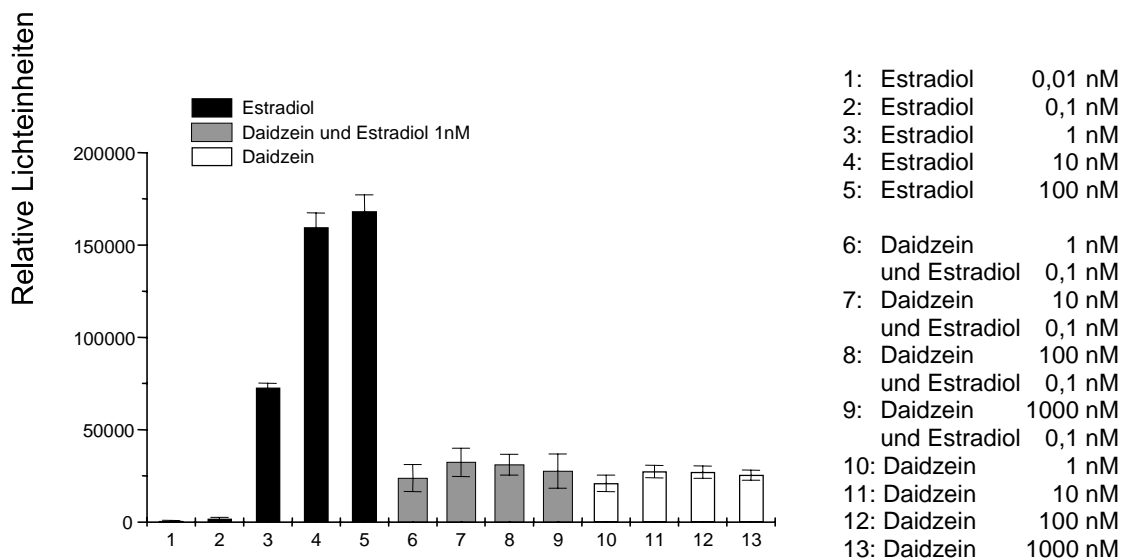


Abb. 11: Reporterinduktion durch Estradiol, Daidzein und Kombinationen von E₂ (0,1 nM) und zunehmenden Daidzein-Konzentrationen (1-1000 nM)

Die nach eingehender Diskussion der Befunde der ersten Serie (Abb. 2 - 6) durchgeführten Kombinationsuntersuchungen des zweiten Blocks (Abb. 7 - 11) zeigen im Ergebnis durchweg eine rein additive Reporterinduktion. In der Gesamtschau machen diese Ergebnisse deutlich, welchen

wesentlichen Einfluss die gewählte Estradiolkonzentration in dem biologischen System haben kann.

4 Diskussion und Ausblick

In der aktuellen Diskussion um mögliche Gefährdungen von Mensch und Tier durch sogenannte Umwelthormone spielen Chemikalien mit Östrogen-ähnlicher Wirkung eine zentrale Rolle (European Community 1997; Toppari et al. 1996; Mäkelä et al. 1999). Die Frage, welche tatsächlichen Gefährdungen unter realistischen Expositionsszenarien von solchen Stoffen ausgehen, wird dabei kontrovers diskutiert (Übersicht: Müller et al. 1995; Bolt & Degen 2000). Dies hängt u. a. damit zusammen, dass eine Risikobewertung in Bezug auf das sehr komplexe endokrine System schwierig ist und auf verschiedenen Feldern noch Forschungsbedarf besteht. Belastungen durch östrogenartig wirkende synthetische Stoffe (sogenannte Xenoöstrogene) müssen zudem vor dem Hintergrund der physiologischen Variation endogener Hormonspiegel und der unvermeidbaren Aufnahme an Phytoöstrogenen mit der Nahrung gesehen werden (Bolt et al. 1998; Degen et al. 1999). Ein für die Bewertung wichtiger Aspekt ist daher auch die Aufklärung von Kombinationseffekten beim Zusammenwirken von Östrogenen synthetischen und natürlichen Ursprungs.

Insgesamt stehen inzwischen einander ergänzende *in vitro*-Testsysteme zur Verfügung, die es uns erlauben, Vergleiche zwischen reinen Proliferationsstimuli und endogenen bzw. transgenen Reporterageninduktionen auf Protein- und mRNA-Niveau zu ziehen (Hopert et al. 1998; Mußler & Eisenbrand 1995). Dies erlaubt eine umfassende *in vitro*-Charakterisierung der ausgewählten Testverbindungen und weiterer Stoffe.

Die bisher im Verbundprojekt erhaltenen Untersuchungsergebnisse stehen in Einklang mit der Annahme additiver Wirkungen von östrogenartig wirkenden Umweltchemikalien, Phytoöstrogenen aus der Nahrung und endogenen Hormonen. Der gewählte Ansatz, nämlich verschiedene Konzentrationen an Xenoöstrogen bei zwei *unterschiedlich* hohen Estradiolkonzentrationen

zu prüfen, erwies sich in der Untersuchung möglicher Kombinationswirkungen als wichtiger Punkt. Wegen der steilen, nicht linearen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für den starken Östrogenrezeptor-Agonisten Estradiol ist es nicht ohne weiteres möglich zu erkennen, ob die zweite Komponente additiv oder überadditiv wirkt. Da in unseren Versuchen auch Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die jeweiligen Xenoöstrogene mit erstellt wurden, könnte in fraglichen Fällen noch die Methode der Isobolen für eine weitere Evaluation herangezogen werden (Griefahn et al. 2000).

Ein anderes (populäres) Verfahren für eine Analyse von Kombinationswirkungen, nämlich die Effekt-Summation, wird von Kortenkamp und Altenburger (1998) kritisiert, die anhand von Beispielen zeigen, dass es für Xenoöstrogengemische zu falschen Interpretationen führt. Die Autoren diskutieren ferner Publikationen, in denen überadditive Effekte übersehen worden sind (Kortenkamp & Altenburger 1998). Doch in keinem Fall waren dies potenzierende Wirkungen in der Größenordnung, die ursprünglich Anlass zu erheblicher Aufregung und Besorgnis gab (vgl. Einleitung).

Dennoch hat die Frage nach der Wirkung von Gemischen für die umwelttoxikologische Diskussion über hormonartig wirkende Chemikalien weiterhin große Bedeutung. Zunächst unabhängig davon, ob Schwellenwerte anzunehmen sind, implizieren unsere Ergebnisse, dass sich die Wirkungen der Einzelkomponenten eines Gemisches in Abhängigkeit von der Konzentration addieren. Auf dieser Grundlage sind weitere Untersuchungen zu Kombinationswirkungen in umweltrelevanten, d. h. niedrigen Konzentrationen geplant. Ferner soll die Relevanz unserer *in vitro*-Ergebnisse im Tierversuch (*in vivo*) exemplarisch geprüft werden.

5 Literatur

Akademie der Wissenschaften zu Berlin (1992). Umweltstandards. Berlin, New York: de Gruyter.

Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guilette LJ, McLachlan JA (1996). Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272: 1489-1492.

Ashby J, Lefevre PA, Odum J, Harris CA, Routledge EJ, Sumpter JP (1997). Synergy between synthetic estrogens? *Nature* 385: 494.

Bolt HM, Degen GH (2000). Hormoneeffekte von Chemikalien in Nahrung und Umwelt. Zur Diskussion von Wirkungen östrogenen Stoffe als "endokrine Disruptoren". *Chemie in unserer Zeit* (im Druck).

Bolt HM, Schuhmacher US, Degen GH (1998). Special aspects of endocrine modulators and environmental risk assessment of existing chemicals. *EUROTOX Newsletter* 21 (3): 72-75.

Colburn T (1995). Environmental estrogens: health implications for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 7): 135-136.

Colburn T, Dumanoski D, Myers JP (1996). Die bedrohte Zukunft. München: Droemer Knaur.

Degen GH, Bolt HM (2000). Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int Arch Occup Environ Health* (im Druck).

Degen GH, Foth H, Kahl R, Kappus H, Neumann HG, Oesch F, Schulte-Hermann FRH (1999). Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xenoöstrogene. Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der DGPT. *DGPT-Forum* 24: 30-36 und *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* 4: 367-374.

Diel P, Smolnikar K, Michna H (1999). In vitro test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. *Planta Med* 65: 197-203.

European Community (1997). European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife (2-4 December 1996, Weybridge, UK). Report of proceedings. Publication EUR 17549, Paris, France.

Gaido KW, McDonnell DP, Korach KS, Safe S (1997). Estrogenic activity of chemical mixtures: Is there synergism? *CIIT Activities* 17: 1-7.

Griefahn et al. 2000 (hier in Arbeitsphysiologie 2)

Hopert AC, Beyer A, Frank K, Strunck E, Wünsche W, Vollmer G (1998). Characterization of estrogenicity of phytoestrogens in an endometrial-derived experimental model. *Environ Health Perspect* 106: 581-586.

Kortenkamp A, Altenburger R (1998). Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. *Sci Total Environm* 221: 59-73.

Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson J-A (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139: 4252-4263.

McLachlan JA (1997). Synergistic effect of environmental estrogen: Report withdrawn. *Science* 277: 462-463.

Mäkelä S, Hyder SM, Stancel GM (1999). Environmental estrogens. In: Oettel M, Schillinger E (eds.): Estrogens and antiestrogens (pp 613-663). Berlin: Springer-Verlag (Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 135/II).

Müller AMF, Makropoulos V, Bolt HM (1995). Hormonartig wirkende Substanzen in Umwelt und Nahrung. Ihre toxikologische Bedeutung. *Dt Apotheker Ztg* 135: 17-24.

Mußler B, Eisenbrand G (1995). Bestimmung des hormonellen Potentials von Lebensmittelinhaltsstoffen in einem Zellkultursystem mit stabil transfizierten Reporter genen. *Lebensmittelchemie* 49: 10-26.

Raamamoorthy K, Wang F, Chen IC, Norris JD, McDonell DP, Leonard LS, Gaido KW, Bocchinfuso WP, Korach KS, Safe S (1997a). Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology* 138: 1520-1527.

Raamamoorthy K, Wang F, Chen IC, Safe S, Norris JD, McDonell DP, Gaido KW, Bocchinfuso WP, Korach KS (1997b). Potency of combined estrogenic pesticides. *Science* 275: 405-406.

Sachverständigenrat für Umweltfragen (1994). Umweltgutachten 1994. Stuttgart: Metzler-Poeschel.

Saunders P (1998). Oestrogen receptor beta (ER β). *Rev Reprod* 3: 164-171.

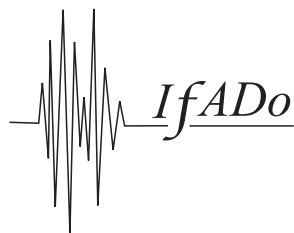
Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Gierwerman A, Grandjean P, Guillette L, Jegou B *et al.* (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104 (Suppl 4): 741-803.

Arbeitsphysiologie *heute*

Bd. 2 (2000)

Herausgegeben von

H.M. Bolt
B. Griefahn
H. Heuer
W. Laurig



Dortmund

ISBN 3-00-005984-9

Alle Rechte vorbehalten.

© *IfADo*, Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund
Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund
Tel.: 0231/1084-0
Fax: 0231/1084-308
<http://www.ifado.de>

Druck: Koffler-Druck, Dortmund

Printed in Germany

Vorwort

Im Rahmen der Projektplanungen im *IfADo* wurden in einem moderierten Workshop im Laufe des Jahres 1998 übergreifende Themengebiete identifiziert, die für die mittel- und langfristige Projektplanung des Instituts von Bedeutung erscheinen. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die Thematik von Kombinationswirkungen im Institut interdisziplinär bearbeitet werden sollte.

Eine weitere Vertiefung der internen Diskussion erfolgte in einem Workshop „Kombinationswirkungen“, der am 16.04.1999 im Institut stattfand und der erstmals Beiträge aus verschiedenen Projekten und Fachdisziplinen des Instituts für eine übergreifende Betrachtung vereinte. In der Aufarbeitung dieser Diskussion entstand der Vorschlag, die Ergebnisse des Workshops weiter zu vertiefen und in dem hiermit vorgelegten 2. Jahresband unserer Schriftenreihe „Arbeitsphysiologie heute“ niederzulegen.

Mit diesem Vorlauf ist der vorgelegte Band einem übergreifenden Generalthema gewidmet. Er soll einerseits Diskussionen aus dem Institut nach außen anregen, andererseits aber auch dazu dienen, die interne Diskussion des Themas von Kombinationswirkungen weiter zu fördern.

Univ.-Prof. Dr. Dr. Hermann M. Bolt
(Institutsdirektor des *IfADo*)