

**Wirkung von Analgetika auf *Caenorhabditis elegans* –
Ein Beitrag zur Abschätzung von Umweltfolgenwirkungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Karsten Junghanns

Betreuerin:

Prof. Dr. Heidi Foth

Gutachter/Gutachterin:

Prof. Dr. Wim Wätjen, Halle

PD Dr. Claudia Röhl, Kiel

23.11.2023

Referat

Arzneimittel (AM) gelangen nach ihrem Gebrauch, in der Regel über das Abwasser, in die Umwelt. Analgetika stellen eine große Gruppe unter den Stoffen mit möglicher Umweltrelevanz und einem Jahresverbrauch von > 80 t dar. Mehrere Wirkstoffe aus dieser Gruppe wurden wiederholt im Oberflächenwasser nachgewiesen.

Da keine Gesamtstoffbilanz für AM verfügbar ist, wurde im Jahr 2021 bei einem Dienstleister eine Sonderstudie für ausgewählte Analgetika in Auftrag gegeben und ausgewertet. Nach dieser Studie nimmt im Jahr 2020 unter den abgefragten Wirkstoffen mit einem Gesamtverbrauch von ca. 1.212 t Ibuprofen die Spitzenposition ein, gefolgt von Metamizol mit ca. 969 t, Paracetamol mit ca. 476 t, ASS mit ca. 459 t, Diclofenac mit ca. 74 t und Naproxen mit ca. 34 t. Für AM die vor Einführung einer verpflichtenden Umweltrisikobewertung zugelassen wurden, besteht ein Datendefizit in Bezug auf eine mögliche Umweltfolgewirkung. Das betrifft einen Großteil aller AM, darunter auch viele Analgetika.

Der zweite Teil der Arbeit leistet einen Beitrag dieses Defizit in Bezug auf Analgetika zu reduzieren. Dafür wurden vier verschiedene toxikologische Tests am Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) durchgeführt.

Es wurde Diclofenac, eine Mischexposition der Wirkstoffe Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol sowie Kläranlagenablaufwasser verwendet. Als Futter dienten *Escherichia coli*, die während ihrer Kultivierung verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen ausgesetzt waren. Sie wurden in der Versuchsanordnung mit den unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen im Medium von *C. elegans* kombiniert.

Innerhalb von 48 h konnten keine akuttoxischen Wirkungen auf *C. elegans* festgestellt werden. Eine Exposition mit Diclofenac (2 mmol/l) über die gesamte Lebensspanne reduzierte die mediane Lebensspanne auf 43 % (95 % KI; 0,23-0,81). Wurden zusätzlich konditionierte Bakterien (Diclofenac 2 mmol/l) eingesetzt, sank die mediane Lebensspanne weiter auf 30 % (95 % KI; 0,17-0,55). In beiden Gruppen mit Kläranlagenablaufwasser kam es zu einer Reduktion der medianen Lebenszeit auf 91 % (95 % KI; 0,49-1,68 bzw. 0,46-1,81). Bei der Mischexposition (20 µmol/l je Wirkstoff) wurde eine Reduktion der medianen Lebensspanne auf 70-84 % (95 % KI; 0,35-1,39, 0,44-1,61 bzw. 0,43-1,50) festgestellt. Mit steigender Diclofenac-Konzentration verlängerte sich die Reproduktionsphase von *C. elegans* um mehrere Tage und die höchste Eiablagerrate trat um ein bis zwei Tage später auf. Die toxikologischen Tests zeigten, dass *C. elegans* als Modellorganismus für Experimente mit Kläranlagenablaufwasser geeignet ist und dass der Einsatz von konditionierten *E. coli* Auswirkungen innerhalb einer Nahrungskette abbilden kann und damit den toxikologischen Kenntnisstand erhöht.

Junghanns, Karsten: Wirkung von Analgetika auf *Caenorhabditis elegans* - Ein Beitrag zur Abschätzung von Umweltfolgewirkungen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Arzneimittel.....	1
1.2	Derzeitige Situation und rechtliche Regelungen für Altarzneimittel	1
1.3	Eigenschaften von Arzneimitteln hinsichtlich der Bewertung von Umweltfolgewirkungen.....	3
1.4	Eintragungspfad und Nachweisbarkeit von Arzneimitteln in der Umwelt	6
1.5	Abgabemenge und Verbrauch von Arzneimitteln	7
1.6	Beispiele bekannter Umwelttoxizität und nachgewiesene Schädigung von Organismen durch Arzneimittel.....	9
1.7	Betrachtungen zu Auswirkungen in der Nahrungskette, Bioakkumulation	10
1.8	Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i> und Futter <i>Escherichia coli</i>	11
2	Zielstellung.....	13
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Material.....	14
3.1.1	Organismen	14
3.1.2	Chemikalien	14
3.1.3	Lösungen	16
3.1.4	Medien	17
3.1.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
3.2	Methoden	19
3.2.1	IQVIA-Sonderstudie Arzneimittelverbrauch	19
3.2.2	Auswahl Medium.....	21
3.2.3	Stoffmengenkonzentration der Lösungen	21
3.2.4	Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
3.2.5	Konditionierung von <i>E. coli</i>	22

3.2.6	Kontaminationsprüfung von <i>E. coli</i>	23
3.2.7	Herstellung des Bakterienkonzentrates von <i>E. coli</i>	23
3.2.8	Konzentrationsbestimmung der Bakteriensuspension von <i>E. coli</i>	23
3.2.9	Verdünnungsausstrich von <i>E. coli</i> und Erstellung einer Kalibrationskurve OD ₆₀₀	23
3.2.10	Kultivierung von <i>C. elegans</i>	24
3.2.11	Bleichesynchronisation von <i>C. elegans</i>	24
3.2.12	Kombinationen von <i>C. elegans</i> mit <i>E. coli</i> in den Versuchsreihen	25
3.2.13	Untersuchungen zur akuten Toxizität an <i>C. elegans</i>	26
3.2.14	Untersuchungen zur Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	26
3.2.15	Untersuchungen zur Lokomotion von <i>C. elegans</i>	26
3.2.16	Untersuchungen zur Nachkommenschaft von <i>C. elegans</i>	27
3.2.17	Statistische Auswertung	27
4	Ergebnisse	29
4.1	IQVIA-Sonderstudie Arzneimittelverbrauch.....	29
4.2	Untersuchungen zur akuten Toxizität an <i>C. elegans</i>	30
4.2.1	Diclofenac und Kläranlagenablaufwasser.....	30
4.2.2	Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol.....	31
4.3	Untersuchungen zur Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	32
4.3.1	Diclofenac und Kläranlagenablaufwasser.....	32
4.3.2	Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol.....	36
4.4	Untersuchungen zur Lokomotion von <i>C. elegans</i>	37
4.4.1	Diclofenac und Kläranlagenablaufwasser.....	37
4.4.2	Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol.....	39
4.5	Untersuchungen zur Nachkommenschaft von <i>C. elegans</i>	40
4.5.1	Diclofenac und Kläranlagenablaufwasser.....	40
4.5.2	Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol.....	45
5	Diskussion.....	47
5.1	Arzneimittelverbrauchsmenge und Kriterien für eine Umweltrisikobewertung	47

5.2	Wirkung der verwendeten Arzneimittel auf <i>C. elegans</i>	55
5.3	Bewertung und Verwendbarkeit als Modellorganismus.....	62
5.4	Mögliche Ansatzpunkte zur Problemlösung für einen besseren Umweltschutz	68
6	Zusammenfassung.....	73
7	Literaturverzeichnis	74
8	Thesen.....	80
Erklärungen		

Abkürzungsverzeichnis

Ablauf-W	Ablaufwasser
abs.	absolut
AM	Arzneimittel
AMG	Arzneimittelgesetz (Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln)
ASS	Acetylsalicylsäure
ATC Klassifikation	anatomisch-therapeutisch-chemische Klassifikation
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BLAC	Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, USA</i>
COX	Cyclooxygenase
daf/DAF	<i>abnormal dauer formation</i>
DDD	definierte Tagesdosis (<i>defined daily dose</i>)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	mittlere wirksame Konzentration (<i>half maximal effective concentration</i>)
ECHA	Europäische Chemikalienagentur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FOXO	<i>Forkhead-Box-Protein O</i> (Transkriptionsfaktor)
GKV	gesetzliche Krankenversicherung
ILS	<i>Insulin/insulin-like signaling</i>
IMS Health	<i>Intercontinental Marketing Service Health</i>
IQVIA	IQVIA Commercial GmbH & Co. OHG (Nachfolgeunternehmen von IMS Health)
KBE	koloniebildende Einheit
KI	Konfidenzintervall
LAWA	Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LC ₅₀	mittlere letale Konzentration
LD ₅₀	mittlere letale Dosis

LOEC	niedrigste Konzentration bei der ein Effekt auftritt (<i>lowest observed effect concentration</i>)
MEC	gemessene Umweltkonzentration (<i>measured environmental concentration</i>)
NGM	<i>Nematode Growth Medium</i>
NGM _k	<i>Nematode Growth Medium</i> komplett
NOEC	höchste Stoffkonzentration, bei der kein Effekt auftritt (<i>no observed effect concentration</i>)
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OTC	rezeptfrei in der Apotheke erhältlich (<i>over the counter</i>)
PEC	erwartete Umweltkonzentration (<i>predicted environmental concentration</i>)
PNEC	Konzentration, bei der kein Effekt in der Umwelt zu erwarten ist (<i>predicted no-effect concentration</i>)
SRU	Sachverständigenrat für Umweltfragen
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
UBA	Umweltbundesamt
ZE	Zähleinheit

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Eingesetzte Chemikalien und Hersteller.	14
Tab. 2: Spezifikationen der Arzneimittelwirkstoffe.	15
Tab. 3: Eingesetzte Lösungen und Zusammensetzung.	16
Tab. 4: Eingesetzte Medien und Zusammensetzung.	17
Tab. 5: Eingesetzte Geräte und Verbrauchsmaterialien, Bezeichnungen und Hersteller.	18
Tab. 6: Kombinationen der Diclofenac-Konzentrationen im Flüssigmedium von <i>C. elegans</i> und der mit Diclofenac konditionierten <i>E. coli</i>	25
Tab. 7: Arzneimittelverbrauch der Jahre 2017 und 2020 für ausgewählte Analgetika/Antiphlogistika.	29
Tab. 8: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Diclofenac gruppiert nach gleich konditionierten <i>E. coli</i>	35
Tab. 9: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Diclofenac ausgewählter Relationen.	35
Tab. 10: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Mischexposition.	36

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung Lebenszyklus <i>C. elegans</i> (eigene Abbildung).	12
Abb. 2: Akute Toxizität <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten <i>E. coli</i>	30
Abb. 3: Akute Toxizität <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac, Ablaufwasser und unkonditionierten <i>E. coli</i>	30
Abb. 4: Akute Toxizität <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten <i>E. coli</i>	31
Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurve: <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten <i>E. coli</i>	32
Abb. 6: Kaplan-Meier-Kurve: <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac, Ablaufwasser und unkonditionierten <i>E. coli</i>	32
Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurve: <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten <i>E. coli</i>	36
Abb. 8: Veränderungen im Bewegungsverhalten von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten <i>E. coli</i>	37
Abb. 9: Veränderungen im Bewegungsverhalten von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac, Ablaufwasser und unkonditionierten <i>E. coli</i>	37
Abb. 10: Veränderungen im Bewegungsverhalten von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten <i>E. coli</i> ausgewählter Gruppen in Tag-genauer Darstellung.	38
Abb. 11: Veränderungen im Bewegungsverhalten von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten <i>E. coli</i>	39
Abb. 12: Anzahl Nachkommen pro Nematode von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten <i>E. coli</i>	40
Abb. 13: Anzahl Nachkommen pro Nematode von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac, Ablaufwasser und unkonditionierten <i>E. coli</i>	40
Abb. 14: Anzahl Nachkommen pro Nematode und Tag von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten <i>E. coli</i>	42
Abb. 15: Anzahl Nachkommen pro Nematode und Tag von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Diclofenac, Ablaufwasser und unkonditionierten <i>E. coli</i>	43
Abb. 16: Anzahl Nachkommen pro Nematode von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten <i>E. coli</i>	45
Abb. 17: Anzahl Nachkommen pro Nematode und Tag von <i>C. elegans</i> bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten <i>E. coli</i>	46

1 Einleitung

1.1 Arzneimittel

Arzneimittel sind ein wichtiger Bestandteil von Therapiekonzepten in der Medizin und werden schon seit langer Zeit erfolgreich angewendet. Dabei wird auf eine umfangreiche Zahl von Substanzen und Zubereitungen mit unterschiedlichen Wirkstoffen, denen verschiedenste Wirkmechanismen zugrunde liegen, zurückgegriffen. Einige Arzneimittel werden schon seit vielen Jahren oder Jahrzehnten unverändert eingesetzt, andere beruhen auf neuesten Forschungs- und Entwicklungsergebnissen. Das Arzneimittelgesetz (AMG) regelt, welche Stoffe oder Zubereitungen als Arzneimittel gelten, und beschreibt, dass sie „zur Anwendung im oder am menschlichen oder tierischen Körper bestimmt sind“ (§ 2 AMG).

1.2 Derzeitige Situation und rechtliche Regelungen für Altarzneimittel

Mit der Anwendung von Arzneimitteln können Risiken verbunden sein. Arzneimittel unterliegen in Deutschland einer Zulassungspflicht (§ 21 AMG) und müssen bestimmte Kriterien erfüllen. Dabei muss bspw. eine Risikobewertung vorgenommen werden und eine Unbedenklichkeit vorliegen, das heißt, „dass sie bei bestimmungsgemäßem Gebrauch [keine] schädliche Wirkungen haben, die über ein nach den Erkenntnissen der medizinischen Wissenschaft vertretbares Maß hinausgehen“ (§ 5 AMG). In diesem Zusammenhang ist nicht nur die Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit als Risiko definiert, sondern auch unerwünschte Auswirkungen auf die Umwelt, die im Verhältnis zu einem positiven therapeutischen Nutzen bewertet werden (§ 4 Abs. 27, 28 AMG).

Arzneimittel, die bereits vor Inkrafttreten des novellierten Arzneimittelgesetzes im Jahre 1978 auf dem Markt oder vor der Wiedervereinigung in der DDR im Verkehr waren, erhielten in einer Übergangsregelung eine fiktive Zulassung. Für diese Arzneimittel musste eine Nachzulassung beantragt werden. Im Jahre 2005 wurden die Nachzulassungsverfahren abgeschlossen. Wegen des fehlenden Nachweises der Wirksamkeit, Unbedenklichkeit und pharmazeutischen Qualität wurde einigen Präparaten die Zulassung versagt. Aufgrund der aufschiebenden Wirkung der Klagen der betroffenen Unternehmen sind einige Präparate mit fiktiver Zulassung, z. B. Tenuate und Contractubex, immer noch im Verkehr (BfArM, 2020; Kurth, 2008; AMIce, 2022).

Bei der heutigen Medikamentenforschung und -entwicklung ist oft ein biochemischer Mechanismus bekannt, der mit dem Medikament gezielt beeinflusst werden soll, und der bei der Neuentwicklung eine entscheidende Rolle spielt. Für einige Arzneimittel, welche häufig eingesetzt werden und schon sehr lange auf dem Markt sind, ist dieser Mechanismus jedoch nicht oder nur teilweise aufgeklärt. So ist bspw. der Wirkmechanismus von Metamizol nicht

abschließend erforscht (Lampl und Likar, 2014). Bei Paracetamol konnte ebenfalls erst nach jahrzehntelanger Forschung ein Wirkmechanismus identifiziert werden (Graham *et al.*, 2013). Bei beiden Wirkstoffen kommt es zu einer Inhibition der Cyclooxygenase (COX). Im Rahmen der Pharmakovigilanz wird kontinuierlich eine nachträgliche Beurteilung bereits zugelassener Arzneimittel vorgenommen, in der die oftmals langjährige klinische Anwendung und Erfahrung zeigt, dass ein Einsatz der Arzneimittel sinnvoll und sicher ist.

Mehrere Änderungen des AMG haben zu einer Ausdehnung des Anforderungskatalogs für Neuzulassungen geführt. So wurde das anfänglich nicht vorgesehene Kriterium der Umweltrisikobewertung für Tierarzneimittel im Jahr 1990 und für Humanarzneimittel im Jahr 1993 eingeführt. Im Falle von Tierarzneimitteln kann dies auch Versagungsgrund der Zulassung sein (§ 4 Abs. 27, 28 AMG). Die Verpflichtung für die leitfadenskonforme Erhebung von umweltrelevanten Daten folgte in den Jahren 1998 bzw. 2006 (SRU, 2007, Tz. 114, 116). Die Versagung der Zulassung wegen Umweltrisiken ist allerdings die Ausnahme. Beispiele hierfür sind Antiparasitika für Weidetiere, Zinkoxid und ein Hormonpräparat für Tauben (UBA, 2018a). Von der hormonell wirksamen Substanz Altrenogest, welches zur Brunstsynchronisation bei Schweinen eingesetzt wird, ist bekannt, dass es den Anteil von männlichen Fischen in einer Population erhöht. Der Einsatz wurde aus diesem Grund in der Schweinezucht seit 2016 mit besonderen Anwendungsvorgaben belegt (UBA, 2018b).

Für Arzneimittel, die sich bereits vor Inkrafttreten der regulatorischen Änderungen auf dem Markt befanden, fehlt eine Umweltrisikobewertung und sie werden diesbezüglich als Altarzneimittel bezeichnet. Dies betrifft den Großteil aller zugelassenen Arzneimittel (SRU, 2007, Tz. 33, 114; UBA und BfArM, 2017, S. 22).

Aufgrund der fehlenden und lückenhaften Daten für Altarzneimittel ist die Risikobewertung, insbesondere die Umweltrisikobewertung, schwierig. Es gibt viele verschiedene Herausforderungen, die dabei betrachtet werden müssen. Die Arzneimittel werden bspw. in hohen Mengen abgegeben und umfassen eine Vielzahl von Wirkstoffen und Wirkmechanismen. Die Gesamtmenge aller in Verkehr gebrachten Wirkstoffe und deren strukturverwandten Stoffe ist eine Schätzung (siehe Kapitel 1.5).

Nach Daten des Umweltbundesamtes (UBA) aus dem Jahr 2012 waren ca. 2.300 Humanarzneimittelwirkstoffe auf dem deutschen Markt. Etwa die Hälfte, ca. 1.200 Wirkstoffe, werden als potentiell umweltrelevant eingestuft. Das UBA gibt für diese umweltrelevanten Stoffe (Jahr 2012) unter Bezugnahme auf IMS *Health (Intercontinental Marketing Service Health)* einen Verbrauch von ca. 8.120 t an. Unter den Wirkstoffen mit mehr als 80 t Jahresverbrauch werden zwei Drittel von lediglich 16 Wirkstoffen eingenommen. Die fünf Analgetika Ibuprofen, Metamizol, Acetylsalicylsäure, Paracetamol und Diclofenac bilden unter diesen Stoffen die größte Gruppe (Ebert *et al.*, 2014). Alle Wirkstoffe entfalten zumindest einen Teil ihrer Wirkung durch die Inhibition der Cyclooxygenase. Aufgrund der

herausragenden Bedeutung der Analgetika bzw. COX-Hemmer wird im Folgenden ein besonderes Interesse auf diesen Stoffen liegen.

Eine Umweltfolgewirkung der Stoffe nach ihrem Einsatz ist dabei unklar und eine summativ, strukturierte pharmakologische Aufarbeitung fehlt (SRU, 2007, Tz. 116). Bei den Betrachtungen können Kriterien wie Löslichkeit, Akkumulationsverhalten in Böden oder Sediment, Abbaubarkeit, Persistenz und Wirksamkeit von Metaboliten oder Abbauprodukten einen Einfluss auf die Bewertung haben. Hinzu kommt, dass bei der Neuzulassung von Arzneimitteln nur das jeweilige Produkt betrachtet wird, nicht jedoch die Gesamtmenge des Wirkstoffes, der auch in anderen Packungsgrößen, Indikationsbereichen und von anderen Herstellern vertrieben wird. Vollständige Monographien zu den einzelnen Wirkstoffen fehlen (SRU, 2007, Tz. 5, 144). Siehe dazu auch Kapitel 1.3.

Abseits der arzneilichen Nutzung treten die Wirkstoffe oder strukturverwandte Stoffe ebenfalls in Erscheinung. Sie unterliegen in diesem Fall jedoch nicht dem Arzneimittelrecht. So kommen bspw. Acetylsalicylsäure und Salicylsäure in Lebensmitteln wie Linsen mit bis zu 1.600 µg pro 100 g vor (Kęszycka *et al.*, 2017). Außerdem finden beide Stoffe Verwendung als Flussmittel beim Löten (Tumalski, 1994). Die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) gibt für Acetylsalicylsäure ein Tonnageband von 100 t bis 1.000 t pro Jahr an. Die Menge wird für hergestellte oder importierte Mengen auf Grundlage aller Registrierungs dossiers, die der ECHA vorliegen, angegeben. Zwischenprodukte und Mengen, für die Vertraulichkeit beantragt wurde, sind darin nicht enthalten (ECHA, 2020a). Für die als Biozid gelistete Salicylsäure wird von der ECHA unter anderem eine Verwendung in Kosmetik- und Pflegeprodukten, Wasch- und Reinigungsprodukten, Parfümen, Polier- und Wachsprodukten, Gummiprodukten, Dünger, in der pharmazeutischen und chemischen Industrie, in der Wasseraufbereitung oder bei der Behandlung von Metalloberflächen genannt (ECHA, 2020b).

1.3 Eigenschaften von Arzneimitteln hinsichtlich der Bewertung von Umweltfolgewirkungen

Arzneimittel sind keine einheitliche Stoffgruppe, sondern decken ein breites Spektrum verschiedener Stoffe mit unterschiedlichen Eigenschaften ab. Unter ihnen befinden sich anorganische Stoffe wie Metalloxide und organische Stoffe wie Pflanzenextrakte, Blutprodukte, naturidentische Stoffe wie Glykoside oder Antibiotika, bis hin zu synthetischen Wirkstoffen (SRU, 2007, Tz. 9).

Bei der Bewertung der Umweltrelevanz müssen, wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, nicht nur die Abgabemengen der Arzneistoffe, sondern auch deren physikochemischen bzw. pharmazeutischen Eigenschaften beachtet werden. Dementsprechend spielen etwa

Persistenz, Mobilität, Verfügbarkeit, Akkumulation und Degradation, und damit auch die Verweildauer in der Umwelt, ebenfalls eine entscheidende Rolle. So kann eine Anreicherung und Bindung von Stoffen in Gewässersediment oder Klärschlamm erfolgen und diese zu einem späteren Zeitpunkt wieder freigesetzt werden (siehe Kapitel 1.4). Einige Stoffe, bspw. Metalle, sind nicht degradierbar bzw. mineralisierbar. Andere Stoffe, etwa Blutprodukte, lassen hingegen eine kurze Verweildauer in der Umwelt vermuten (SRU, 2007, Tz. 9).

Anhand ihrer Eigenschaften können Arzneimittel gruppiert werden. Im "gemeinsamen Bericht vom UBA [Umweltbundesamt] und BfArM [Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte] über die Prüfung von Handlungsmöglichkeiten zur Minimierung von Humanarzneimitteln (inkl. Rückständen) in das Rohwasser der Trinkwasseraufbereitung" (UBA und BfArM, 2017) werden Vorschläge für Leitsubstanzen gemacht und eine Einteilung der Substanzen nach Eintragsmenge und Abbaubarkeit vorgenommen. Die Verbrauchsmengen beziehen sich auf das Jahr 2013. In der Gruppe „hohe Eintragsmenge, gute Abbaubarkeit“ führt Ibuprofen mit 1.081 t die Liste an. Ein weiterer Vertreter ist Diclofenac mit 83 t. In der Gruppe „geringe Eintragsmenge, schlechte Abbaubarkeit“ befindet sich Clofibrinsäure. Trotz eines Einsatzverbotes von Clofibrinsäure seit 2003 und dem damit verbundenen Eintrag von 0 t, ist der Metabolit von Clofibrat noch immer im Trinkwasser nachweisbar (UBA und BfArM, 2017, S. 29ff.).

Besonders strenge Kriterien gelten für die Reinheit des Trinkwassers. Die Trinkwasserverordnung fordert nicht nur, dass „chemische Stoffe nicht in Konzentrationen enthalten sein [dürfen], die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen“ (§ 6 Abs. 1 TrinkwV), sondern auch sonstige Verunreinigungen „sollen so niedrig gehalten werden, wie dies nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik mit vertretbarem Aufwand unter Berücksichtigung von Einzelfällen möglich ist“ (§ 6 Abs. 3 TrinkwV). Stoffe werden als trinkwasserrelevant eingestuft, wenn sie „mehrfach und/oder in Konzentrationen > 0,1 µg/L in Trinkwässern in Deutschland gefunden wurden und weil ihr Auftreten aufgrund ihres hohen Verbrauchs (> 1 t/Jahr) und ihrer Stoffeigenschaften (mobil, schwer biologisch abbaubar) auch in Zukunft zumindest lokal im Trinkwasser wahrscheinlich ist“ (UBA und BfArM, 2017, S. 23). Dennoch wird in Trinkwasser eine für den Menschen wirksame Konzentration nicht zu erwarten sein, da die Menge einer indirekt über Trinkwasser aufgenommenen Dosis deutlich geringer als eine definierte Tagesdosis ist (Webb *et al.*, 2003, S. 165).

Bei der heutigen Arzneimittelneuentwicklung ist oft die Kenntnis und Nutzung eines bestimmten Wirkmechanismus bzw. die Interaktion des Wirkstoffes mit einer spezifischen Zielstruktur entscheidend. Auf Arzneimittel mit teilweise jahrzehntelang zurückliegendem Markteintritt trifft das weniger zu. Arzneimittel können neben einer erwünschten auch eine

unerwünschte Wirkung haben. Je zielgerichteter ein Wirkstoff eine bestimmte Struktur beeinflussen kann, umso besser ist seine Wirkung vorhersehbar. Das betrifft ebenso eine unerwünschte Wirkung, die spezifisch, das heißt mechanistisch vorhersagbar, oder unspezifisch, also mechanistisch nicht vorhersagbar sein kann. Nur systematische Untersuchungen können die nicht prognostizierbaren Wirkungen erfassen. Kleine Modifikationen haben bei strukturverwandten Stoffen dazu geführt, dass bei annähernd gleicher Wirkung, die erforderlichen Dosen um bis zu zwei Zehnerpotenzen niedriger liegen können. Beispiele sind Weiterentwicklungen bei Benzodiazepinen, Histaminrezeptorblockern oder Protonenpumpenhemmern. Dies führt jedoch gleichzeitig zu größeren Herausforderungen in der Analytik, um biologisch wirksame Mengen nachweisen zu können (SRU, 2007, Tz. 12).

Einige Wirkstoffe werden nach der Einnahme zum überwiegenden Teil als Metaboliten (bei Ibuprofen z. B. ca. 99 %) ausgeschieden. Über die Umweltrelevanz der Metaboliten von Ibuprofen ist allerdings kaum etwas bekannt. Möglicherweise wird so die Muttersubstanz oder ihre Metaboliten bzw. Transformationsprodukte durch die Bewertung anhand der Abgabemenge über- oder unterschätzt (SRU, 2007, Tz. 16).

In der Regel treten keine isolierten Einzelwirkstoffe in den Umweltmedien auf. Vielmehr sind unterschiedliche Stoffe, oftmals in niedrigen Konzentrationen, in Form einer Mischexposition auf die Organismen wirksam. Diese Arzneimittel, Chemikalien oder natürlicherweise vorkommenden Verbindungen können über gleichgerichtete oder unterschiedliche Wirkmechanismen verfügen. Eine Zuordnung der Effekte auf Einzelwirkstoffe ist oft nicht möglich. Dabei können auch überadditive Effekte auftreten, das heißt, dass der Effekt größer ausfällt, als es die Summe der Einzelwirkstoffe erwarten lassen würde. Eine Gruppierung bzw. gemeinsame Betrachtung von Wirkstoffen mit ähnlicher oder gleicher Wirkung scheint dennoch sinnvoll (SRU, 2007, Tz. 56, 57).

Vom Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU) wird vorgeschlagen ein Programm aufzulegen, welches sich, ähnlich des Altstoffprogrammes für Chemikalien, der Reduzierung des Datendefizites verschreibt und ermöglicht viele Informationen, auch von vergleichbar wirksamen Stoffen, zu bündeln und zu bewerten sowie für eine effektive Aufarbeitung eine wirkstoffbezogene Prioritätenliste von Altarzneimitteln mit Umweltrelevanz zu erstellen (SRU, 2007, Tz. 114, 116, 118).

Das UBA und das BfArM formulieren genau wie der SRU die Forderung nach einer wirkstoffbezogenen, statt einer präparatbezogenen Umweltbewertung in Form eines Monographiesystems. Als besonderes Problem wird benannt, dass bekannte Umweltdaten der Arzneimitteldossiers vertraulich behandelt werden und nicht öffentlich zugänglich sind, und damit auch keine Umweltqualitätsnormen abgeleitet werden können (UBA und BfArM, 2017, S. 22).

1.4 Eintragungspfad und Nachweisbarkeit von Arzneimitteln in der Umwelt

Nahezu alle Arzneimittel sind in Wasser löslich oder transportfähig, weshalb dem aquatischen System eine besondere Bedeutung zukommt. Arzneimittel werden direkt oder indirekt in die Umwelt eingetragen. Mehrfach wurden Rückstände von mehr als 150 Wirkstoffen in verschiedenen Konzentrationen im Oberflächenwasser sowie teilweise im Grund- und Trinkwasser nachgewiesen. Im Trinkwasser lagen die Konzentrationen in der Regel im Bereich von ng/l. Im Oberflächenwasser wurden in den Messprogrammen der Bundesländer, je nach Arzneimittel, Konzentrationen im Bereich von mehreren µg/l ermittelt. In den Jahren 2009-2011 wurden 27 Arzneimittel mit Konzentrationen über 0,1 µg/l im Oberflächenwasser nachgewiesen. Unter diesen Wirkstoffen befinden sich die drei Analgetika Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen. Neben den Röntgenkontrastmitteln wurden auffallend hohe Konzentrationen von Diclofenac mit über 9 µg/l gemessen (Ebert *et al.*, 2014).

Flächendeckende Monitoringdaten liegen nicht vor. Eine Vielzahl von Publikationen beziehen sich auf die Daten des Bund/Länderausschusses für Chemikaliensicherheit (BLAC) sowie des UBA aus den Jahren 2003 und 2014 (Klauer *et al.*, 2020, S. 36; UBA und BfArM, 2017, S. 21f.). Dabei befinden sich unter den Wirkstoffen, die in der Umwelt nachgewiesen wurden, ausschließlich sogenannte Altarzneimittel, für deren Zulassung keine Umweltrisikobewertung erforderlich war (SRU, 2007, Tz. 33).

Erste Untersuchungen zu Arzneimittelrückständen stammen aus den USA der 1970er Jahre. 1994 wurde in Berliner Oberflächengewässern Clofibrinsäure nachgewiesen und führte zu einer höheren Aufmerksamkeit für die Umweltproblematik (SRU, 2007, Tz. 2; Klauer *et al.*, 2020, S. 36). Besonders in Gebieten, in denen vorwiegend Grund- und Oberflächenwasser zur Trinkwassergewinnung verwendet wird, kann dies aufgrund der Reinheitsforderung (siehe Kapitel 1.3) ein Problem darstellen.

Nach dem bestimmungsgemäßen Gebrauch der Humanarzneimittel gelangen diese über Faeces und Urin, bei Externa auch über das Waschen, ins Abwasser. Dabei können je nach Metabolisierung und Eliminationsverhalten der Stoffe unterschiedliche Masseanteile der ursprünglich eingenommenen oder aufgetragenen Dosen unverändert ausgeschieden werden bzw. Abbauprodukte und Metaboliten, die ihrerseits wirksam sein können, ins Abwasser gelangen. Dabei bestehen erhebliche Unterschiede zwischen den Arzneimitteln. Innerhalb einer Gruppe strukturverwandter Stoffe kann sich bereits die therapeutisch wirksame Dosis um den Faktor 5 bis 10 unterscheiden und der Anteil unverändert ausgeschiedener Masseanteile des Wirkstoffes zwischen 20 % und 90 % bewegen (SRU, 2007, Tz. 16).

Auch die unsachgemäße Entsorgung von Arzneimittelresten, bspw. über die Toilette, führt zu einem direkten Eintrag ins Abwasser. Durch die Abwasseraufbereitung werden die Arzneimittel in der Regel unzureichend entfernt und gelangen anschließend ins Oberflächenwasser. Die Eliminationsraten der einzelnen Wirkstoffe sind sehr variabel und reichen von wenigen einstelligen bis zu hohen zweistelligen Prozentanteilen (SRU, 2007, Tz. 37f.).

Durch die unterschiedlichen Anteile von Muttersubstanz und Transformationsprodukten wird nicht nur ihre Bewertung komplexer sondern auch durch niedrigere Konzentrationen der Einzelkomponenten die Nachweisbarkeit erschwert.

Punktuell können Quellen aus der pharmazeutischen Industrie mit einem Eintrag in Abwässer angenommen werden (Klauer *et al.*, 2020, S. 35). Des Weiteren können ausgelöste Arzneimittel aus abgelagertem Abfall auf Altdeponien über das Sickerwasser in die Umwelt gelangen (SRU, 2007, Tz. 29).

Falls Klärschlämme und Dung auf Feldern ausgebracht werden, können Arzneimittel, die im Klärschlamm enthalten sind und Arzneimittel, die in der Tierhaltung eingesetzt wurden, durch Auswaschung ebenfalls in den Boden und in Grund- und Oberflächenwasser eingetragen werden. Analog gilt dies auch für Tierarzneimittel, die bspw. bei Weidehaltung, als Staubfracht von Ställen oder aus Fischzuchtanlagen, ohne diesen Umweg in die Umwelt gelangen (SRU, 2007, Tz. 30, 32).

Das UBA hat zu Arzneimittelnachweisen in der Umwelt eine Datenbank aufgebaut und dazu über 1.500 Publikationen ausgewertet. Es wurde eine Feingliederung nach Emission und Immission, sowie fest und flüssig in 54 Matrices vorgenommen. Über der jeweiligen Nachweisgrenze wurden weltweit 771, EU-weit 596 und deutschlandweit 269 Wirkstoffe nachgewiesen. Diclofenac ist die Substanz mit den meisten Nachweisen und das einzige Schmerzmittel bzw. Antiphlogistikum unter den acht Stoffen, die auf der EU-Beobachtungsliste sind oder waren. Unter den 19 Stoffen, die in allen fünf UN Regionen nachgewiesen wurden, finden sich unter anderem Acetylsalicylsäure (ASS), Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol (UBA, 2019, S. 17f., 36f., 40).

1.5 Abgabemenge und Verbrauch von Arzneimitteln

Für Arzneimittel erfolgt keine bundesweite, einheitliche und öffentlich zugängliche Registrierung. Die Zuständigkeiten sind auf verschiedene Behörden aufgeteilt. Beispielsweise ist für die Zulassung von Humanarzneimitteln das BfArM zuständig, für die Zulassung von Gewebezubereitungen, Gewebe, Allergenen, Arzneimittel für neuartige Therapien, xenogene Arzneimittel und Sera, Impfstoffe, Blutzubereitungen, Knochenmarkzubereitungen und gentechnisch hergestellte Blutbestandteile das Paul-Ehrlich-Institut, und

für die Zulassung von Tierarzneimitteln das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (§ 77 AMG). Die Prüfung der Umweltwirkung wird dagegen für Human- und Tierarzneimittel durch das UBA vorgenommen (UBA, 2020c).

Um die Gesamtmenge der in Verkehr gebrachten Arzneimittel abschätzen zu können, müssen Daten aus einer Vielzahl von Quellen berücksichtigt werden. Diese Quellen sind teilweise öffentlich zugänglich, andere sind nur auszugsweise oder gegen Entgelt verfügbar und liefern so eine heterogene Datenlage.

Das BfArM teilte auf Anfrage mit, es könne keine Angabe zur importierten, hergestellten und abgegebenen Menge der Arzneimittel machen. In dieser Sache verwies es auf den Gemeinsamen Bundesausschuss und die Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (Milz, 2016).

Der Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie, der Verband Forschender Arzneimittelhersteller und die Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände haben auf Nachfrage zur Menge der importierten, hergestellten und abgegebenen Wirkstoffe keine Angabe gemacht. Sie verwiesen auf käuflich zu erwerbende Daten von *IMS Health* bzw. *Insight Health* (Marciniec, 2016; Bejeuhr, 2016; Bauer, 2016).

Zusätzlich zu den abgegebenen Mengen als Human- und Tierarzneimittel addieren sich die Mengen aus einer nichtarzneilichen Anwendung. Wirkstoffe oder strukturverwandte Stoffe werden z. B. in der Industrie als Korrosionsschutzmittel oder Biozid eingesetzt, deren Mengen jedoch ebenfalls nicht genau beziffert werden können (siehe Kapitel 1.2). Dies trifft ebenso auf einen Eintrag aus natürlichen Quellen zu.

Wie bereits im Kapitel 1.2 erwähnt, gibt das UBA einen Verbrauch für umweltrelevante Arzneimittel von 8.120 t an. In einem Ausschussbericht des Deutschen Bundestages zu Arzneimittelrückständen in Trinkwasser und Gewässern aus dem Jahr 2020 wird ebenfalls in Ermangelung valider, aktueller Daten auf die genannten Erkenntnisse des Umweltbundesamtes zurückgegriffen (Klauer *et al.*, 2020, S. 21).

Im Bereich der Verordnungen zu Lasten der gesetzlichen Krankenkassen (GKV) liefert der Arzneiverordnungsreport jährlich Daten zur Abgabemenge von Arzneimitteln. Dort sind die Verordnungen nach Indikationsgruppen aufgeschlüsselt und basieren auf den Verordnungsdaten des GKV-Arzneimittelindex für ambulante Patienten (Schwabe und Ludwig, 2020, S. V). Obwohl beispielsweise Verordnungen auf Privatrezept, Abgaben im Krankenhaus, über die Bundeswehr oder Justizvollzugsanstalten, freiverkäufliche Arzneimittel, Tierarzneimittel, Arzneimittelabgaben über den Großhandel oder gleiche bzw. strukturverwandte Wirkstoffe außerhalb des AMG, z. B. mit Zulassung als Biozid, nicht erfasst werden, können anhand der Verordnungspraxis Rückschlüsse auf die tatsächliche Abgabemenge der einzelnen Stoffe gemacht werden. Zwar dient die DDD (definierte

Tagesdosis) als Therapiemittelvergleich, dennoch kann mit Hilfe der Anzahl der DDD eine tatsächlich abgegebene Masse abgeschätzt werden.

Der gleiche Wirkstoff kann mehreren Indikationsgruppen zugeordnet sein und als Einzelwirkstoff oder in Kombinationspräparaten zum Einsatz kommen. Wie das Beispiel Acetylsalicylsäure eindrücklich zeigt, können die definierten Tagesdosen (DDD) um ein Vielfaches auseinander liegen. Die anatomisch-therapeutisch-chemische Klassifikation (ATC) macht Angaben zu Indikationen und Dosen. Als Thrombozytenaggregationshemmer kommt Acetylsalicylsäure, unabhängig von der Wirkstärke, mit einer Tablette zum Einsatz, typischerweise 100 mg (ATC-Code B01AC06); als Analgetikum findet es mit einer DDD von 3.000 mg (ATC-Code N02BA01) Verwendung (DIMDI, 2020; Schwabe und Ludwig, 2020).

Innerhalb der zahnärztlichen Verordnungen dominieren Analgetika und orale Lokalanästhetika, Antibiotika und Antiinfektiva, Antiphlogistika und Fluorpräparate. Diese decken ca. 93 % der insgesamt 7,9 Mio. zahnärztlichen Verordnungen ab. Mit 3,6 Mio. Verordnungen stehen Antibiotika und Antiinfektiva an erster Stelle vor Antiphlogistika mit 2,5 Mio. Verordnungen. Auf Platz drei und vier folgen Fluoridpräparaten mit 0,79 Mio. Verordnungen sowie Analgetika und orale Lokalanästhetika mit 0,39 Mio. Verordnungen. Unter zahnärztlich verordneten Antiphlogistika entfallen 80 % der DDD auf systemisch angewandte nichtsteroidale Antiphlogistika. Unter diesen nimmt Ibuprofen mit 98 % eine herausragende Stellung ein; weit abgeschlagen folgt Diclofenac. Innerhalb der Gruppe der Analgetika entfallen 73 % der insgesamt rund 1,9 Mio. DDD auf Metamizol (Schwabe und Ludwig, 2020, S. 873ff.).

1.6 Beispiele bekannter Umwelttoxizität und nachgewiesene Schädigung von Organismen durch Arzneimittel

Einige Human- oder Tierarzneimittel, bspw. Antiparasitika oder Antibiotika, sind so konzipiert, dass bei bestimmungsgemäßem Gebrauch ein anderer Organismus (z. B. Bakterien oder Parasiten) geschädigt oder getötet werden soll. Falls diese Stoffe in die Umwelt gelangen, ist anzunehmen, dass sie dort außerhalb ihres primären Anwendungsgebietes ebenfalls eine Schadwirkung auf Organismen in der Umwelt haben können. Phylogenetisch sind einige Stoffwechselwege hoch konserviert und werden von verschiedenen Spezies auch ohne enges Verwandtschaftsverhältnis geteilt. Falls bei Nichtzielorganismen nach Eintrag in die Umwelt diese Stoffwechselwege angesprochen werden, kann dort ebenfalls eine Wirkung vermutet werden. Nachweisliche Effekte bei Nichtzielorganismen durch die Anwendung von Arzneimitteln wurden bspw. für Antibiotika, Antiparasitika, hormonell wirksame Stoffe und Schmerzmittel bzw. Antiphlogistika beschrieben (SRU, 2007, Tz. 3, 8, 14; UBA, 2018b).

Diese Auswirkungen können direkt oder indirekt sein. So kann es durch den Einsatz von Antiparasitika bei Weidetieren und den Arzneimittelrückständen im Dung zu einer direkten Schädigung von Wirbellosen, bspw. von Dungkäfer oder Dungfliege, kommen. Außerdem werden durch den reduzierten Dungabbau die Weideflächen von den Tieren teilweise nicht mehr zur Beweidung angenommen. Auswirkungen von Hormonen können sich indirekt über eine Veränderung der Geschlechtszusammensetzung einer Population bemerkbar machen, und damit insgesamt ihre Überlebensfähigkeit gefährden (Kidd *et al.*, 2007; UBA, 2018b).

An männlichen Forellen (*Oncorhynchus mykiss*) konnte beobachtet werden, dass durch den Einfluss von hormonell wirksamen Stoffen (Östrogene) aus Kläranlagenwasser die Vitellogeninproduktion und Bildung von weiblichen Geschlechtszellen angeregt wurde (Harries *et al.*, 1996). Im Wasser des Rheins und zweier ihm zulaufenden Kläranlagenabwässern konnte Pawlowski (2002) in kombinierten Freiland- und Laborversuchen östrogenaktive Substanzen in biologisch wirksamen Konzentrationen nachweisen.

Auf dem indischen Subkontinent waren in den 1990er Jahren drei Geierarten von einem erheblichen Populationsrückgang von mehr als 95 % betroffen. Diclofenac wurde über Rinderkadaver von den Geiern aufgenommen und verursachte bei ihnen Nierenversagen. Die Rinder waren vor Ihrem Tod mit veterinärmedizinischen Dosen Diclofenac behandelt worden (Oaks *et al.*, 2004, S. 630; Green *et al.*, 2004, S. 793f.). Aufgrund der Bedeutung von Nahrungsketten wird im folgenden Kapitel 1.7 näher darauf eingegangen.

1.7 Betrachtungen zu Auswirkungen in der Nahrungskette, Bioakkumulation

In der Umweltwissenschaft werden auch Nahrungsketten betrachtet. Diese sind hierarchisch aufgebaut und Beute-Jäger-Abhängigkeiten werden über verschiedene Trophiestufen dargestellt. Substanzen können sich in einem Organismus auf höherer Trophiestufe anreichern. Stoffe werden zunächst aus der unmittelbaren Umgebung, wie Wasser oder Sediment, aufgenommen und können im Organismus verbleiben. Falls jene Organismen wiederum als Nahrungsquelle dienen, kann es zu einer weiteren Akkumulation kommen. Die Aufnahme und der Metabolismus bzw. die Elimination der Substanz stehen dabei in einem Missverhältnis. Die Persistenz und Lipophilie des Stoffes begünstigen zusätzlich die Akkumulation. Bekannte Beispiele sind Methylquecksilber und Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), welche sich in Vögeln und Fischen anreichern (Fent, 2013, S. 65, 197). Bei der Bioakkumulation können je nach Stoff Anreicherungs-faktoren bis zum 100.000-fachen auftreten (UBA, 2016).

Auch bei Arzneimitteln muss mit einer Bioakkumulationsfähigkeit gerechnet werden. Nicht nur ein einzelner Organismus, sondern alle Mitglieder eines Ökosystems sind den sie umgebenden, bspw. im Wasser gelösten und darin transportfähigen Stoffen ausgesetzt.

Effektschwellen können in den verschiedenen Organismen ganz unterschiedlich gelagert sein. Sowohl eine Aufnahme über die Nahrungskette als auch direkt über andere Aufnahmepfade wie Haut oder Atmungstrakt kann zur Schädigung des Organismus führen. Bei der Bewertung des Umweltrisikos wird eine Datenunsicherheit mit einem Sicherheitsfaktor beaufschlagt. Dabei sind Verfügbarkeit und Eintragspfade von Bedeutung, auf die bereits in Kapitel 1.4 eingegangen wurde.

1.8 Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* und Futter *Escherichia coli*

Fadenwürmer (Nematoden) sind weltweit verbreitet und stellen mit ca. 20.000 Arten die größte Gruppe der *Metazoa*. Sie besetzen unterschiedliche Habitate an Land sowie im Süß- und Salzwasser. Die Vertreter der Familie der *Rhabditidae* sind in der Regel kleiner als 1,5 mm und ernähren sich von Bakterien. Durch die habitatbedingte Belastung mit potenziell toxischen mikrobiellen Ausscheidungsprodukten und Schadstoffen besitzen sie gegenüber diesen Einflüssen eine hohe Toleranzschwelle. Aus der Familie der *Rhabditidae* stammt auch der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), der ein etablierter eukaryontischer Modellorganismus ist und in über 1.000 Laboren weltweit erforscht wird. *C. elegans* ist ein Hermaphrodit mit einer bei jedem adulten Individuum gleichbleibenden Zahl von Somazellen. Er hat bei 20 °C eine Entwicklungszeit vom Ei über verschiedene Larvenstadien zum adulten, fertilen Tier von ca. 4 Tagen. Bei ungünstigen Umweltbedingungen, wie Nahrungsmangel oder hoher Populationsdichte, kann eine Entwicklung zu einem widerstandsfähigen Dauerlarvenstadium eingeleitet werden, in dem die weitere Nahrungsaufnahme eingestellt wird und die Kutikula dieses Larvenstadiums einen verbesserten Schutz bspw. gegenüber Chemikalien oder thermischen Stress bietet. Bei einer Verbesserung der Umweltbedingungen kann die Larve, auch nach mehreren Monaten, die Entwicklung zum adulten Tier fortsetzen. In seiner mehrtägigen Reproduktionsphase werden hunderte Eier gelegt, bis er nach einigen Wochen verstirbt. *C. elegans* hat eine temperaturabhängige Entwicklung und kann in einem Bereich von 12-25 °C sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigmedium kultiviert werden. Aufgrund seiner Transparenz und Größe von ca. 1 mm ist *C. elegans* unter Laborbedingungen mit einem Mikroskop gut zu beobachten und untersuchbar. Sein Genom ist voll sequenziert und eine Vielzahl von zellulären Prozessen weisen speziesübergreifende Ähnlichkeiten auf. 60-80 % der menschlichen Gene haben ein Ortholog in *C. elegans*. Hunderte genetisch unterschiedliche Stämme sind bekannt, darunter isolierte Wildtypen und Mutanten (Bongers und Ferris, 1999; Corsi *et al.*, 2015).

Bakterien kommen ubiquitär vor und stellen eine Nahrungsquelle für *C. elegans* dar. Da in den Experimenten nicht nur *C. elegans* sondern auch die verwendeten Bakterien den

gelösten Wirkstoffen ausgesetzt waren, besteht die Möglichkeit in den Experimenten zwei Trophiestufen zu untersuchen. Damit lassen sich zusätzliche toxikologische Erkenntnisse gewinnen und es wird eine bessere Näherung im Sinne einer simultanen Exposition aller im gleichen Medium lebenden Organismen erreicht. Bei vielen standardisierten Verfahren der Wurmku­ltivierung kommen *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) zum Einsatz. Ihre Kultivierung unter Laborbedingungen ist etabliert und weit verbreitet, weshalb sie auch in den hier beschriebenen Experimenten zur Anwendung kommen werden (Corsi *et al.*, 2015).

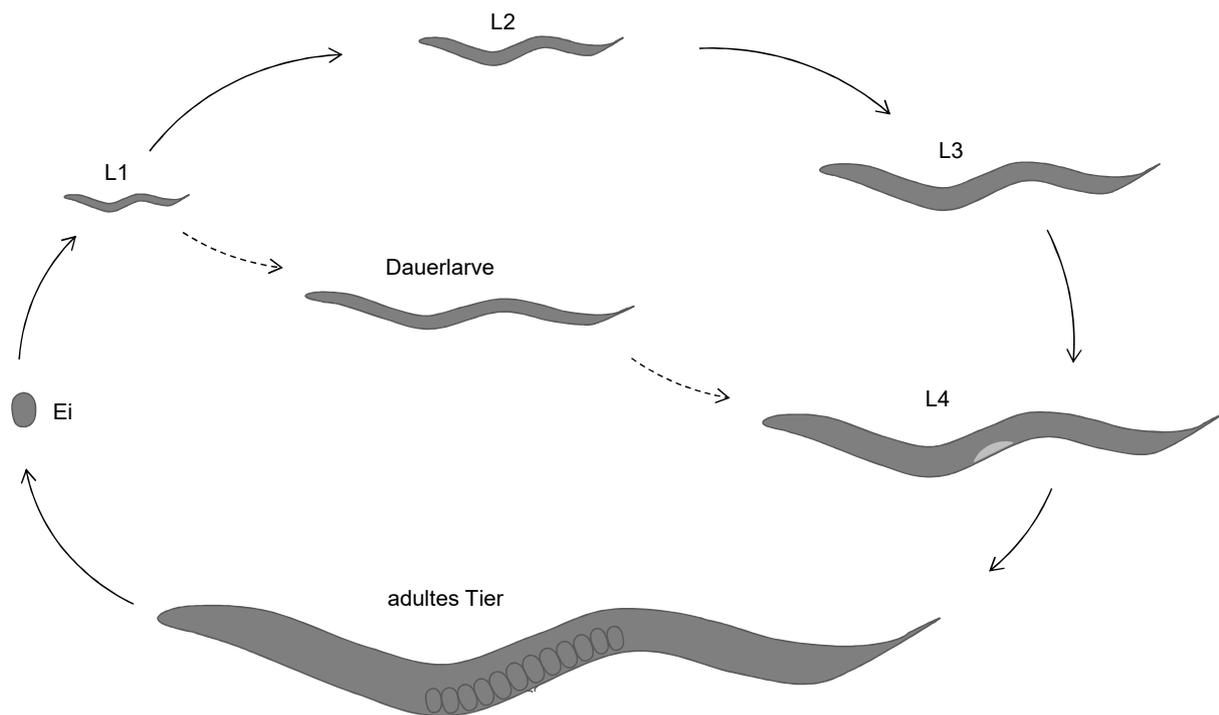


Abb. 1: Schematische Darstellung Lebenszyklus *C. elegans* (eigene Abbildung).

Entwicklung vom Ei über Larvenstadien (L1-L4) zum adulten Tier, alternativer Entwicklungsweg bei ungünstigen Umweltbedingungen von L1 zum Dauerlarvenstadium und Fortsetzung der Entwicklung zu L4 nach Verbesserung der Umweltbedingungen.

2 Zielstellung

Die Pharmakotherapie ist ein unverzichtbarer Bestandteil in der Medizin. Je nach Wirkstoff kommen Arzneimittel in Deutschland im ein- bis vierstelligen Tonnenbereich pro Jahr zum Einsatz. Zu diesem Verbrauch addieren sich strukturverwandte Stoffe, die außerhalb des Arzneimittelrechts eingesetzt werden, und natürlich vorkommende Substanzen. Die Gesamtstoffbilanz für Arzneimittel in Deutschland ist lückenhaft oder liegt nicht vor. Unter den potentiell umweltrelevanten Wirkstoffen, die den Schwellenwert von > 80 t Jahresverbrauch überschreiten, stellen Analgetika eine große Gruppe dar. Aus diesem Grund wird im Folgenden der Fokus auf Substanzen dieser Stoffgruppe gelegt.

Nach ihrer Verwendung gelangen die Arzneimittel, in der Regel über Abwasser, in das Oberflächenwasser. Mehrere Analgetika wurden als umweltrelevant eingestuft und in verschiedenen Umweltmedien nachgewiesen. Eine verpflichtende Umweltrisikobewertung wurde im Arzneimittelrecht 1998 bzw. 2006 für Neuzulassungen eingeführt. Für den Großteil aller bereits zugelassenen Arzneimittel wurde keine Umweltrisikobewertung durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es einen Beitrag zu leisten, mögliche Umweltfolgewirkungen besser abschätzen zu können und das bestehende Datendefizit in Bezug auf Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von Analgetika in der Umwelt abzubauen. Um möglichst umfassende und belastbare Daten zum Arzneimittelverbrauch ausgewählter Analgetika zu erhalten, wird im ersten Teil der Forschungsarbeit eine im Jahr 2021 bei einem Dienstleister beauftragte Sonderstudie ausgewertet. Im zweiten Teil wird der Einfluss einer Exposition mit verschiedenen Konzentrationen und Zusammensetzungen ausgewählter Analgetika auf den etablierten Modellorganismus *C. elegans* untersucht. Es werden Experimente zur akuten und chronischen Toxizität, Lokomotion und Reproduktionstoxizität durchgeführt.

Da nahezu alle Arzneimittel wasserlöslich oder in Wasser transportfähig sind und damit zu Mischexpositionen bei Wasserorganismen führen, hat das aquatische Ökosystem eine besondere Bedeutung. Um dahingehend eine Näherung zu erreichen und einen möglichen Summationseffekt abzubilden, wird neben dem Einzelwirkstoff Diclofenac zusätzlich eine Lösung der vier Wirkstoffe Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol sowie Kläranlagenablaufwasser untersucht.

Durch die Verwendung von Kläranlagenablaufwasser kann einerseits eine typische Mischexposition in der Umwelt, deren Zusammensetzung meist unbekannt ist, untersucht werden, andererseits soll die prinzipielle Eignung des Modellorganismus *C. elegans* in Verbindung mit Untersuchungen von Kläranlagenablaufwasser erprobt werden.

Um mögliche Auswirkungen innerhalb einer Nahrungskette abbilden zu können, wird auch der Effekt von vorexponiertem Futter (*Escherichia coli*-Bakterien) auf *C. elegans* untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Organismen

Für die Experimente wurde ein Stamm des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* vom Wildtyp N2 ausgewählt. Der Stamm VC2010 wurde im Jahr 2012 vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) bezogen (CGC, 2008).

Als Bakterienstamm für die Kultivierung der Fadenwürmer wurde der uraciluxotrophe Bakterienstamm *Escherichia coli* OP50 eingesetzt. Er wurde ebenfalls 2012 vom CGC bezogen (CGC, 2020).

3.1.2 Chemikalien

Tab. 1: Eingesetzte Chemikalien und Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cholesterol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, DE
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhypochloritlösung 10-15 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Pepton aus Fleisch	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Tab. 2: Spezifikationen der Arzneimittelwirkstoffe.

Spezifikation	Diclofenac-Natrium	Ibuprofen	Naproxen	Paracetamol
CAS-Nummer	15307-79-6	15687-27-1	22204-53-1	103-90-2
Molare Masse M	318,14 g/mol	206,28 g/mol	230,26 g/mol	151,16 g/mol
Löslichkeit in Wasser bei	1,5 g/l 20 °C	0,021 g/l 25 °C	0,0159 g/l 25 °C	14 g/l 25 °C
Löslichkeit in Wasser bei	4,715 mmol/l 20 °C	0,102 mmol/l 25 °C	0,069 mmol/l 25 °C	92,617 mmol/l 25 °C
Hersteller/Bezug	Caesar & Loretz, Hilden	Caesar & Loretz, Hilden	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel	Universitätsapotheke Halle (Saale), Halle (Saale)

(Caelo, 2018a, S. 2; Heber und Imming, 2016; Caelo, 2018b; National Center for Biotechnology Information, 2020c; Fagron, 2014; National Center for Biotechnology Information, 2020a; National Center for Biotechnology Information, 2020b)

Die maximale Stoffmengenkonzentration in Wasser wurde errechnet.

Der Wirkstoff Diclofenac-Natrium, welcher in den nachfolgend beschriebenen Experimenten (ab Kapitel 3.2) zum Einsatz kam, wird in den folgenden Darstellungen, Analysen, Grafiken, etc. als Diclofenac bezeichnet.

3.1.3 Lösungen

Tab. 3: Eingesetzte Lösungen und Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
500 µl Bleichelösung	250 µl Natriumhydroxidlösung 5 mol/l 250 µl Natriumhypochloritlösung
Lösung A	0,5 g Cholesterol 100 ml Ethanol absolut
Lösung B (1 mol/l CaCl ₂)	27,8 g CaCl ₂ ad 250 ml dH ₂ O autoklaviert
Lösung C (1 mol/l MgSO ₄)	61,6 g (MgSO ₄ x 7 H ₂ O) ad 250 ml dH ₂ O autoklaviert
Lösung D (1 mol/l KPO ₄ Puffer)	108,3 g (KH ₂ PO ₄) 35,6 g (K ₂ HPO ₄) ad 1 l dH ₂ O pH 6 autoklaviert
Lösung E (Wirkstoffkonzentration je Wirkstoff 40 µmol/l)	15,907 mg Diclofenac-Natrium 10,314 mg Ibuprofen 11,513 mg Naproxen 7,558 mg Paracetamol ad 1,25 l dH ₂ O sterilfiltriert
Natriumhydroxidlösung 5 mol/l	99,9 g Natriumhydroxid ad 500 ml dH ₂ O

3.1.4 Medien

Tab. 4: Eingesetzte Medien und Zusammensetzung.

Medium	Zusammensetzung
Ablaufwasser Kläranlage Halle (Saale)	Probennummer 3424/20 autoklaviert
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar ad 1 l dH ₂ O autoklaviert
LB-Medium (flüssig)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l dH ₂ O autoklaviert
NGM _K -Agar	3 g NaCl 2,5 g Pepton 20 g Agar-Agar 975 ml dH ₂ O autoklaviert nach dem Abkühlen Zugabe von 1 ml Lösung A 0,5 ml Lösung B 1 ml Lösung C 25 ml Lösung D
NGM _K (flüssig)	3 g NaCl 2,5 g Pepton 975 ml dH ₂ O autoklaviert nach dem Abkühlen Zugabe von 1 ml Lösung A 0,5 ml Lösung B 1 ml Lösung C 25 ml Lösung D

3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 5: Eingesetzte Geräte und Verbrauchsmaterialien, Bezeichnungen und Hersteller.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioclav Dampfsterilisator Typ 500 EV-Z	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
Glasangel/Picker		eigene Herstellung aus Pasteurpipette oder Platindraht
Handschuhe Latex	Sempercare	Semperit Technische Produkte, Wien, AT
Handschuhe Nitril	Nitra-Tex	Ansell, Brüssel, BE
Kühlschrank	Kryosafe	Hans-S. Schröder, Hamburg, DE
Mikroskop und Licht	Stemi 2000-C KL 300 LED	Carl Zeiss, Göttingen, DE Schott, Mainz, DE
Pasteurpipetten		Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Petrischale	94 x 16 mm, 40 x 10 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, CH
Pipetten	2,5-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 200 µl 1000 µl	Dr. Ilona Schubert-Laborfachhandel, Leipzig + Eppendorf, Hamburg, DE
Platindraht	≥ 99 % (Reinheit)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Reinstwasseranlage	Werner Barnstead E-pure, D 4632	Wilhelm Werner, Leverkusen, DE
Sicherheitsreaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS 12/2	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Schüttelinkubator	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, US
Spektralphotometer	DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter, Fullerton, US
Sterilfilter	Millex GP 0,22 µm	Merck Millipore, Carringtonwohill, IE
Thermoschrank/Inkubator		
20 °C	9020-0397	Binder, Tuttlingen, DE
37 °C	BB 16	Heraeus Instruments, Hanau, DE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, US
Waage	PLJ 3000-2CM	Kern, Balingen, DE
	Mettler AE 240/9	Mettler Instrumente, CH
Zentrifuge	Megafuge 1.0R Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Osterode, DE
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, CH

3.2 Methoden

Alle Prozesse orientieren sich an etablierten Verfahren zur Kultivierung von *C. elegans* und *E. coli*, einschließlich der Herstellung für notwendige Lösungen und Medien (Stiernagle, 2006, S. 3ff.). Modifikationen beruhen auf Laborerfahrungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wim Wätjen, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, sowie des Instituts für Umwelttoxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. Heidi Foth an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder aus gewonnenen Erkenntnissen der durchgeführten Vorversuchsreihen.

Um Kontamination zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte unter aseptischen Bedingungen, mit sterilen Arbeitsgeräten und wenn möglich, unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

3.2.1 IQVIA-Sonderstudie Arzneimittelverbrauch

Bei der IQVIA Commercial GmbH & Co. OHG (IQVIA), dem Nachfolgeunternehmen von IMS Health, wurde eine Sonderstudie in Auftrag gegeben. Angelehnt an die vom UBA vorgenommene Eingrenzung, sollten vor allem für Analgetika bzw. Antiphlogistika und Antipyretika umfangreiche und belastbare Daten generiert werden. Dafür wurde nach Daten zur gesamten hergestellten Menge/Import von Arzneimitteln in Deutschland, bzw. deren Abgabemenge in Apotheken und Krankenhäusern, inklusive freiverkäuflicher Arzneimittel und Abgabe an andere Abnehmer, z. B. Tierärzte, Großhandel, etc. gefragt. Die Daten sollten nach Wirkstoffmenge in Kilogramm bzw. Tonnen (keine DDD) aufgeschlüsselt sein und insbesondere Mengen aus Kombipräparaten erfassen. Zusätzlich sollten Daten zur Verwendung außerhalb des Arzneimittelrechts, bspw. als Biozid, enthalten sein. Außerdem sollte eine Übersicht zum Gesamtverbrauch der Arzneimittel, indikationsgruppen- bzw. stoffgruppenübergreifend, und eine Feingliederung für Analgetika/Antiphlogistika/Antipyretika mit detaillierten Angaben zu Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, ASS, Paracetamol und

Metamizol geliefert werden. Nach Abstimmung zu möglichen lieferbaren Daten und Inhalten der Sonderstudie wurde die Studie vom Institut für Umwelttoxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im August 2021 beauftragt. Die Datenperiode umfasst die Kalenderjahre 2017 und 2020 mit Monatsaufbruch. Das entsprach dem größtmöglichen von IQVIA lieferbaren Abstand für volle Kalenderjahre, einschließlich des aktuellen vollen Kalenderjahres. Dabei wurden Mono- und Kombipräparate berücksichtigt. Es liegen Daten für die Substanzen Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, ASS, Paracetamol und Metamizol als Summenwerte der Zählheiten (ZE) vor. „Die kleinste sinnvolle Einheit einer jeweiligen Darreichungsform, die an einen Patienten abgegeben werden kann“ (IQVIA, 2021a), wird als Zählheit bezeichnet. IQVIA (2021a) gibt als Erhebungsgegenstand die „Daten des IQVIA *PharmaScope National* und des IQVIA DKM in Verbindung mit zusätzlichen Informationen (z. B. *Backdata* und optionale Zusatzmodifikationen) [an]. Die Daten werden auf Produktebene abgeglichen und harmonisiert, um den deutschen Arzneimittelverbrauch abzubilden. [...] Mit der Erfassung der Rezepte, die zu Lasten der gesetzlichen Krankenversicherung ausgestellt werden, wird der GKV-Markt in IQVIA *PharmaScope National* [für den Apothekensektor] abgedeckt. Datenbasis bilden die abgerechneten Rezepte für den GKV-Markt, die für Offizin-Apotheken über die Apothekenrechenzentren erfasst werden inkl. der Daten für die parenteralen Zubereitungen. Die Anteile der Privatrezepte und der Abgaben ohne Rezept, wird durch das repräsentative IQVIA Apotheken-Panel erhoben und abgedeckt. Die zusätzlich integrierten Versandhandelsabgaben werden auf Basis eines repräsentativen Versandhandels-Panels abgedeckt. Der IQVIA DKM erfasst [für den Kliniksektor] durch die Krankenhaus versorgenden Apotheken bei rund 500 Akutkrankenhäuser[n] (IQVIA Krankenhauspanel) den Arzneimittelverbrauch auf den einzelnen Krankenhaus-Stationen (Basis: Kostenstellen). Bei der Hochrechnung der Daten werden 4 verschiedene Bettengrößenklassen, 15 Fachrichtungen und 7 IQVIA Gebiete berücksichtigt. [Der Markt wird definiert als:] Arzneimittel der anatomischen Klassifikation (A-V) gemäß EphMRA [unter] Ausschluss der Nichtarzneimittel und des Apothekenrandsortiments“.

Für die Auswertung und Veröffentlichung der Sonderstudien­daten liegt ein Gestattungs­schreiben von IQVIA vor (IQVIA, 2022). Zur Ermittlung der Gesamtwirkstoffmenge wurde im betrachteten Zeitraum die Anzahl der ZE eines jeden Präparates mit der Einzeldosis des entsprechenden Wirkstoffes multipliziert und im Anschluss die präparatbezogenen Wirkstoffmengen zu einer wirkstoffbezogenen Gesamtmenge summiert. In Kombinations­präparaten wurden mehrfach vertretene Wirkstoffe jeweils stoffbezogen nur einmal berücksichtigt. Für einige Arzneimittel mit variablen Einzeldosen, z. B. Sirupe oder Cremes zur Anwendung bei Erwachsenen oder Kindern, wurde anhand der Herstellerangabe eine Standarddosierung verwendet. Falls diese in dem gelieferten Datenbankauszug nicht vorlag,

wurde mit Hilfe der Pharmazentralnummer eine Standarddosierung recherchiert oder durch eine Dosisangabe ersetzt, die typischerweise einer Einzeldosis dieses Wirkstoffes und der korrespondierenden Darreichungsform entspricht. Falls auch diese nicht vorlag oder Unklarheiten in Bezug auf variable Dosen oder Dosisspannen auftraten, wurde auf die kleinste stoffbezogene Einzeldosis zurückgegriffen, welche in der Datenbank verfügbar war. Homöopathische Arzneimittel wurden in der Gesamtbilanz nicht berücksichtigt.

3.2.2 Auswahl Medium

Durch Vorversuche wurden drei verschiedene Medien, K-Medium, S-Medium und NGM_K (*Nematode Growth Medium* komplett), auf ihre Eignung als Kultivierungsmedium von *C. elegans* überprüft. Dazu wurden je 40 jungadulte Fadenwürmer von einer Kultivierungsplatte gepickt, in die Nährmedien gegeben und täglich Tote sowie Lebende gezählt. Die Konzentrationen des Wirkstoffes Diclofenac wurden auf 10 µmol/l, 100 µmol/l, 1.000 µmol/l durch Verdünnung einer Stammlösung eingestellt. Die Stammlösung war zur Erhöhung der Löslichkeit mit DMSO (Dimethylsulfoxid) angelegt. Bakterien wurden in einer Konzentration von 10⁹ KBE/ml hinzugefügt. Das Gesamtvolumen betrug 2 ml. Dreimal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel.

Von den drei Testmedien wurde das flüssige NGM_K für die Kultivierung von *C. elegans* ausgewählt, welches eine gute Löslichkeit des Wirkstoffes ermöglicht und keine Verklumpungen, Wolkenbildung, Ausfällungen oder Ähnliches von Stoffwechselprodukten und Inhaltsstoffen der Medien verursacht. Außerdem konnten im Rahmen der Vorversuche prozessbedingte Schwachstellen, wie Löslichkeitsprobleme, Zähl- und Medienwechselalgorithmen, erkannt und für den Hauptversuch entsprechend angepasst werden.

3.2.3 Stoffmengenkonzentration der Lösungen

In Vorversuchsreihen wurde zum Eingrenzen des Konzentrationsbereiches zunächst die Löslichkeit von Diclofenac überprüft. Dazu wurde eine logarithmische Reihe der Konzentrationen 4 mmol/l, 2 mmol/l, 1 mmol/l und 0,5 mmol/l in dH₂O sowie in LB-Medium, als auch NGM_K erstellt. Bei einer Konzentration von 4 mmol/l löste sich der Wirkstoff nur in dH₂O vollständig. Die Konzentration von 4 mmol/l wurde daraufhin für die folgenden Hauptversuche in LB-Medium und im NGM_K ausgeschlossen. Deshalb wurde für die Experimente die Lösungskonzentrationen von Diclofenac auf 2 mmol/l, 1 mmol/l und 0,5 mmol/l festgelegt. Zum Einstellen der verschiedenen gewünschten Wirkstoffkonzentrationen wurde eine Stammlösung von 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O verwendet. Eine entsprechende Menge Stammlösung wurde vorgelegt und mit zweifach konzentriertem Medium und dH₂O ergänzt.

Eine Lösung aus vier verschiedenen Arzneimitteln diene exemplarisch als Modell für eine Umgebung mit Mehrfachbelastung. Ein Mischungsverhältnis kann bspw. anhand der bekannten Abgabemenge festgelegt werden. Aufgrund des Datendefizites und der erheblichen Unsicherheiten in Bezug auf die Plausibilität der Arzneimittelmengen und tatsächlich gemessenen Konzentrationen (siehe auch Kapitel 5.1), wurde in diesem Fall auf ein äquimolares Mischungsverhältnis zurückgegriffen. Hier wurde ebenfalls in einem Vorversuch die Löslichkeit des Wirkstoffgemisches überprüft und zum Einstellen der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen eine Stammlösung verwendet. Analog wie oben beschrieben, wurde eine entsprechende Menge Stammlösung vorgelegt und mit zweifach konzentriertem Medium und dH₂O ergänzt. Aufgrund der Ausfällung musste die Konzentration der Mischexpositionsstoffe auf jeweils 40 µmol/l in der Stammlösung reduziert werden (Lösung E). Es wurde eine Konzentration je Wirkstoff von 20 µmol/l für Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol für die Exposition festgelegt.

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert, um ein Ausfällen zu vermeiden.

3.2.4 Kultivierung von *E. coli*

E. coli stellte während der Experimente die Futterquelle für *C. elegans* dar. Für die Kultivierung von *E. coli*-Bakterien des Stammes OP50 wurde das etablierte LB-Medium eingesetzt. Von einem Ausstrich auf einer LB-Agar-Platte wurde eine Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in einen vorbereiteten Erlenmeyerkolben mit flüssigem LB-Medium gegeben. Dieses Medium wurde für 18 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 150 rpm inkubiert. Nach erfolgter Aufkonzentrierung wurde es auf Kontamination überprüft, fraktioniert und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.5 Konditionierung von *E. coli*

Um einen möglichen Effekt zu erfassen, der durch eine Anreicherung des Wirkstoffes oder dessen Metaboliten im Soma des Bakteriums zustande kommt, wurden die Bakterien in einer wirkstoffhaltigen Nährlösung kultiviert. Dazu wurde die in Kapitel 3.2.4 beschriebene Vorgehensweise wie folgt modifiziert: Das Medium wurde zunächst mit der Hälfte der Flüssigkeit angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurde durch Zugabe einer sterilfiltrierten Stammlösung (4 mmol/l Diclofenac) auf die entsprechenden Konzentrationen (2 mmol/l, 1 mmol/l, 0,5 mmol/l) eingestellt, mit sterilem destillierten Wasser auf das Endvolumen ergänzt und mit 10⁷ KBE aus einer Starterkultur beimpft. Im Anschluss wurden alle drei Konzentrationen und die Negativkontrolle parallel geführt und nach dem Ernten die Bakterienkonzentration erneut bestimmt. Für die Mischexposition wurde analog verfahren

und die Konzentration der Wirkstoffe auf jeweils 20 $\mu\text{mol/l}$ eingestellt (Zusammensetzung und Konzentrationen siehe Kapitel 3.2.3). Dadurch kann zusätzlich eine Wirkung erfasst werden, die der Wirkstoff bereits während der Kultivierung von *E. coli* haben könnte.

3.2.6 Kontaminationsprüfung von *E. coli*

Um eine Kontamination auszuschließen, wurde nach der Bakterienvermehrung mit sterilen Impfösen ein Dreifractionenausstrich auf einer LB-Agar-Platte angefertigt. Anschließend wurde die Platte bei 37 °C für mindestens 12 h inkubiert. Bei der Bildung von kontaminationsfreien Einzelkolonien wurden die Bakterien zur weiteren Verwendung freigegeben.

3.2.7 Herstellung des Bakterienkonzentrates von *E. coli*

Nach der Bakterienkultivierung wurde zur Herstellung eines Bakterienkonzentrates die Suspension bei 40.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Ein Zweihundertstel des Ausgangsvolumens wurde vom Überstand aufgenommen und zurückgehalten. Der restliche Überstand wurde von den Bakterienpellets abgenommen und verworfen. Anschließend wurden alle Pellets im zurückgehaltenen Überstand resuspendiert und auf 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt.

Im Falle der Konditionierung mit Wirkstoff wurden die Bakterien dreimal mit LB-Medium gewaschen, um wirkstoffhaltige Rückstände des Kulturmediums zu entfernen.

3.2.8 Konzentrationsbestimmung der Bakteriensuspension von *E. coli*

Über die Messung der Extinktion bzw. optischen Dichte (OD) einer Lösung kann die Konzentration der Inhaltsstoffe berechnet werden. Dazu wurde im Spektralphotometer die OD bei 600 nm durch zweifache Messung und Bilden des arithmetischen Mittels bestimmt. Für die Messung wurde das Konzentrat zweihundertfach mit LB-Medium verdünnt und mit einem Gesamtvolumen von 1.000 μl gemessen. Zur Referenzierung des Spektralphotometers wurde eine Probe LB-Medium verwendet. Im Falle der Konditionierung der *E. coli* wurde nach Abschluss der Inkubation von allen Kulturmedien zwei Proben entnommen und diese zusätzlich unverdünnt vor der Aufkonzentrierung vermessen.

3.2.9 Verdünnungsausstrich von *E. coli* und Erstellung einer Kalibrationskurve OD₆₀₀

Um eine verlässliche quantitative Aussage über das Bakterienwachstum und die Anzahl der Bakterien in einer Lösung treffen zu können, wurde eine Kalibrationskurve der OD₆₀₀ für das Spektralphotometer erstellt. Von einem Bakterienkonzentrat wurden jeweils zwei Proben mit

2,5 µl, 5,0 µl, 7,5 µl, 10,0 µl, und 12,5 µl entnommen und mit LB-Medium auf 1.000 µl ergänzt, in eine Küvette überführt und die OD₆₀₀ bestimmt.

Vom gleichen Bakterienkonzentrat wurden zwei Stammlösungen durch Entnahme von 5,0 µl und 10,0 µl und Ergänzen auf 1.000 µl mit LB-Medium erstellt. Von jeder dieser Stammlösungen wurde eine Verdünnungsreihe mit LB-Medium erstellt. Es wurde von den Lösungen mit 10.000-facher und 50.000-facher Verdünnung je zweifach 100 µl, 50 µl, 25 µl auf LB-Agar-Platten pipettiert, ausgestrichen, bei 37 °C über Nacht inkubiert und die KBE ausgezählt und arithmetisch gemittelt. So wurden Bruchteile der Ausgangslösung von 100.000, 200.000, 400.000, 500.000, 1.000.000, 2.000.000 erreicht. Die ausgezählten KBE wurden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Ausgangskonzentration der KBE/ml zu errechnen. Dieses Vorgehen wurde dreimal wiederholt. Die Anzahl der KBE wurde gegen die gemessene OD₆₀₀ aufgetragen und durch lineare Regression eine Geradengleichung ermittelt.

3.2.10 Kultivierung von *C. elegans*

C. elegans wurde auf Agar-Platten bei 20 °C im Inkubator in Kultur gehalten. Dafür wurde ein NGM_K-Agar hergestellt und in einer dünnen Schicht in Petrischalen mit 94 mm Durchmesser gegossen. Nach dem Abkühlen wurden 80 µl Bakteriensuspension auf die Platte pipettiert, mit einem Drigalskispatel gleichmäßig verteilt und für maximal 18 h bei 37 °C inkubiert. Die vorbereiteten Platten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Um Stress durch Überpopulation und Futtermangel zu vermeiden, wurden zum Kulturerhalt zweimal wöchentlich zehn bis 15 adulte Tiere auf neue Platten umgesetzt.

3.2.11 Bleichesynchronisation von *C. elegans*

Damit Nematoden eines Alters für die Experimente verwendet werden konnten, wurden Eier mittels einer Bleichesynchronisation gewonnen. Auf eine NGM_K-Agar-Platte mit mehreren zehn bis hundert graviden Adulten wurden 2,5 ml NGM_K-Lösung pipettiert. Durch mehrmaliges Aufnehmen und Rückpipettieren der NGM_K-Lösung wurden die Tiere und Eier von der Platte gelöst und in ein 2 ml Sicherheitsreaktionsgefäß überführt. Nach einer Sedimentationszeit von eineinhalb Minuten hatten sich die Nematoden und Eier abgesetzt und der Überstand wurde auf 500 µl reduziert. Anschließend wurde 500 µl Bleichelösung zugesetzt, 1 s mit Hilfe des Vortexers gemischt und nach 90 s für eine Minute bei 7.000 rpm zentrifugiert. Nach erneuter Reduktion des Überstandes auf 500 µl und Ergänzen auf 2.000 µl mit NGM_K-Lösung, wurde erneut für eine Minute zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das gebildete Pellet aus lebensfähigen Eiern und Somabruchstücken wurde nach Reduktion des Überstandes auf 500 µl resuspendiert und

konnte anschließend auf einer Agar-Platte oder in einem Flüssigmedium zur weiteren Verwendung ausgebracht werden.

3.2.12 Kombinationen von *C. elegans* mit *E. coli* in den Versuchsreihen

Für die in den Kapiteln 3.2.13 bis 3.2.16 beschriebenen Experimente wurde *C. elegans* im Flüssigmedium verschiedenen Wirkstoffkonzentration von Diclofenac (2 mmol/l, 1 mmol/l, 0,5 mmol/l, 0 mmol/l) ausgesetzt. Als Futterquelle für *C. elegans* dienten *E. coli*-Bakterien, die ihrerseits während der Kultivierung den vier verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt wurden. Diese konditionierten bzw. unkonditionierten *E. coli* wurden in Form einer Bakteriensuspension den Nematoden zugeführt und auf 10^9 KBE/ml *E. coli* eingestellt. Die 16 verschiedenen Kombinationen der Wirkstoffkonzentrationen im Medium von *C. elegans*, mit den konditionierten *E. coli*, erfolgten nach dem in Tab. 6 dargestellten Schema.

Tab. 6: Kombinationen der Diclofenac-Konzentrationen im Flüssigmedium von *C. elegans* und der mit Diclofenac konditionierten *E. coli*.

<i>C. elegans</i> / <i>E. coli</i>	0 mmol/l	0,5 mmol/l	1 mmol/l	2 mmol/l
0 mmol/l	1	2	3	4
0,5 mmol/l	5	6	7	8
1 mmol/l	9	10	11	12
2 mmol/l	13	14	15	16

Die verschiedenen Medium- und Futterkombination der Tab. 6 sind nummeriert. Die Kombination in Feld 1 der Tab. 6 fungierte als Negativkontrolle.

Es erfolgte zusätzlich die Mitführung einer Probe, bei der im NGM_K nach Tab. 4, das destillierte Wasser durch Kläranlagenablaufwasser ersetzt wurde. Des Weiteren wurde eine Probe mit destilliertem Wasser und einer Konzentration von 4 mmol/l Diclofenac sowie eine Probe mit autoklaviertem Ablaufwasser der Kläranlage mitgeführt. Für diese drei Kombinationen wurden unkonditionierte *E. coli* verwendet. Die insgesamt 19 Gruppen wurden während der Versuchsreihen parallel geführt.

Für die Mischexposition wurde auf die Eckpunkte der Matrix, analog den Kombinationen 1, 4, 13 und 16, zurückgegriffen. Die Konzentration der vier Wirkstoffe Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol betrug jeweils 0 bzw. 20 μ mol/l (siehe Kapitel 3.2.3). Dies betraf sowohl das Medium von *C. elegans* während der Versuche, als auch das Medium während der Kultivierung von *E. coli*. Bei diesen vier Gruppen wurde gleichermaßen eine Bakteriensuspension mit 10^9 KBE/ml *E. coli* eingesetzt. Auch diese wurden parallel geführt.

Zur Einstellung der einzelnen Konzentrationen im Medium wurde die NGM_K-Lösung zunächst zweifach konzentriert hergestellt und anschließend mit der Stammlösung bzw. destilliertem Wasser verdünnt. Das zusätzlich eingebrachte Volumen durch Zugabe der Bakterien wurde berücksichtigt. Die jeweiligen Versuchsreihen wurden in drei Durchgängen wiederholt.

3.2.13 Untersuchungen zur akuten Toxizität an *C. elegans*

Larven des Stadiums L4 wurden für 48 h bei 20 °C in 40 mm Petrischalen in Lösungen mit einem Gesamtvolumen von 2 ml inkubiert. Jeweils zehn alterssynchrone Nematoden wurden in eine Petrischale überführt und nach 24 h sowie 48 h gezählt und bewertet. Nematoden mit Spontanbewegung oder Bewegung nach Provokation durch Berührung wurden als lebend gewertet, Nematoden ohne Bewegung wurden als tot gewertet. Tiere die untrennbar zusammenhängen, deren Organe heraushingen oder bei Schlupf der Larven im adulten Tier (interner Schlupf), wurden als nicht bewertbar eingeordnet und entfernt.

3.2.14 Untersuchungen zur Lebensspanne von *C. elegans*

L4-Larven wurden bei 20 °C in 40 mm Petrischalen in Lösungen mit einem Gesamtvolumen von 2 ml inkubiert. Jeweils zehn alterssynchrone Nematoden wurden in eine Petrischale überführt, täglich gezählt und bewertet. Alle zwei Tage wurden die lebenden Exemplare in neues Testmedium überführt. Das Vorgehen wurde so lange wiederholt, bis alle Nematoden als tot oder zensiert gewertet waren.

Als lebend wurden Tiere gewertet, die sich entweder von allein bewegten, sich bei mehrmaligem Anstoßen mit einer Glasangel bewegten, nur Kopf oder Schwanz bewegten oder einen pumpenden Pharynx hatten. Würmer ohne Reaktion wurden als tot gewertet und entfernt. Tiere die untrennbar zusammenhängen, deren Organe heraushingen oder bei Schlupf der Larven im adulten Tier (interner Schlupf), wurden als zensiert eingeordnet und entfernt.

3.2.15 Untersuchungen zur Lokomotion von *C. elegans*

Während der Untersuchung zur Lebensspanne wurde bei den Nematoden zusätzlich eine Bewertung der Bewegungsfähigkeit vorgenommen (Kriterien für lebende, tote und zensierte Nematoden sind im Kapitel 3.2.14 beschrieben). Dafür wurde das Kulturgefäß vorsichtig dreimal geschwenkt und die Reaktion der Nematoden beobachtet. Lebende Nematoden wurden in drei Kategorien (A-C) eingeteilt. Alle Toten wurden der Kategorie D zugeordnet. In Kategorie A wurden Tiere mit Spontanbewegung eingeordnet. Die verbleibenden wurden mit der Glasangel an Kopf, Schwanz und Körpermitte berührt. Bei Bewegung des ganzen

Körpers wurden sie in Kategorie B, bei Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder pumpenden Pharynx in Kategorie C eingeordnet.

3.2.16 Untersuchungen zur Nachkommenschaft von *C. elegans*

Zur Untersuchung der Nachkommenschaft wurden zehn alterssynchrone L4-Laven in eine 40 mm Petrischale mit Lösungen im Gesamtvolumen von 2 ml umgesetzt und bei 20 °C inkubiert. Alle zehn Würmer einer Gruppe wurden täglich in eine neue Petrischale mit neuem Testmedium überführt, um adulte Tiere und Eier zu trennen. Die Petrischalen mit den abgelegten Eiern wurden für 24-30 h bei 20 °C weiter inkubiert, bis die aus den Eiern geschlüpften Larven ausreichend groß und gut zählbar waren. Durch das Einhalten dieser Zeitspanne konnte außerdem eine weitere Generation der ältesten geschlüpften Larven ausgeschlossen werden. Mit Hilfe einer dünn ausgezogenen Glaspipette wurden die geschlüpften Larven einzeln aufgenommen und ausgezählt. Dieses Vorgehen wurde ca. 11-15 Tagen durchgeführt, bis zwei Tage hintereinander keine Eiablage der Ausgangspopulation mehr erfolgte.

3.2.17 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2007 in Tabellen erfasst und zusammengestellt. Für die lineare Regression der Kalibrationskurve wurde ebenfalls Excel verwendet. Zur Grafikerstellung und Analyse, einschließlich des Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) und Ermittlung der medianen Überlebenszeit mit Konfidenzintervallen, Verhältnissen und p-Wert wurde GraphPad Prism 9 genutzt.

Alle 19 Gruppen wurden parallel geführt und bieten so eine erhebliche Anzahl von Kombinationen der Darstellung in Graphen, als auch von möglichen Vergleichen einzelner Gruppen untereinander. Daher wurden insbesondere alle Gruppen mit identisch konditionierten *E. coli* sowie alle Gruppen mit identischer Mediumkonzentration, mit der jeweiligen Gruppenkontrolle und der Negativkontrolle verglichen. Zusätzlich wurde ein Vergleich der jeweiligen Konzentrationsminima und -maxima vorgenommen. Auf die Darstellung aller Relationen wurde verzichtet. Stattdessen orientiert sich die Darstellung an einer Gruppierung nach identisch konditionierten *E. coli*. Aufgrund des explorativen Charakters des Studiendesigns, konzentriert sich die Analyse der Ergebnisse auf die Darstellung von erkennbaren Mustern. Nematoden die im weiteren Verlauf der Versuchsdurchführung ausgeschlossen wurden, sind trotz gleichartiger Bewertungskriterien unterschiedlich benannt. Da zensierte Nematoden in der Kaplan-Meier-Kurve im weiteren Verlauf das Gewicht eines nachfolgenden Ereignisses verändern, wurde in Abgrenzung dazu für ausgeschlossene Nematoden bei der Untersuchung zur akuten Toxizität der Terminus

„nicht bewertbar“ gewählt. Am Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde im Rahmen einer statistischen Beratung durch Herrn apl. Prof. Dr. Andreas Wienke die Bewertung der Ergebnisse abgestimmt. Statistische Tests wurden zurückhaltend eingesetzt und bei der Auswertung wurde bewusst auf den Begriff Signifikanz verzichtet. Damit wird den aktuellen Ansichten zur Interpretation von Ergebnissen Rechnung getragen (Amrhein *et al.*, 2019, S. 307; Wasserstein *et al.*, 2019).

4 Ergebnisse

4.1 IQVIA-Sonderstudie Arzneimittelverbrauch

Die untenstehende Tabelle 7 zeigt den Arzneimittelverbrauch der Wirkstoffe ASS, Diclofenac, Ibuprofen, Metamizol, Naproxen und Paracetamol mit separater Ausweisung des Klinik- und des Apothekenanteils für die Jahre 2017 und 2020. In beiden Zeiträumen überwog bei allen Wirkstoffen deutlich der Anteil, welcher über Apotheken abgegeben wurde. Der Teil, der über Kliniken abgegeben wurde, stellte nur ein kleines Segment der Gesamtmenge und liegt bei ASS, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol deutlich unter 10 %. Eine Abweichung von diesem Muster stellte Metamizol dar, welches von Kliniken zu ca. 18 % (Jahr 2017) und ca. 15 % (Jahr 2020) abgegeben wurde. Ibuprofen nahm im Jahr 2020 mit einer Gesamtabgabemenge von über 1.210 t die Spitzenposition ein. Mit knapp 970 t folgte Metamizol auf Platz zwei, Paracetamol stand mit etwas mehr als 475 t auf Platz drei und ASS mit knapp 460 t auf Platz vier. Zum Schluss folgten auf Platz fünf und sechs Diclofenac mit knapp 75 t und Naproxen mit etwas mehr als 33 t. Bei allen Wirkstoffen, mit Ausnahme von ASS, war im Jahr 2020 im Vergleich zum Jahr 2017 eine Zunahme des Gesamtverbrauchs zu sehen. Die Zunahmen fielen bei Naproxen (ca. 4,5 t) und Diclofenac (ca. 0,2 t) sehr klein aus. Die Abgabemenge von Diclofenac an Kliniken verzeichnete einen leichten Rückgang um ca. 0,6 t, welcher jedoch durch einen erhöhten Anteil der Apotheken kompensiert wurde. Das gleiche traf auf Ibuprofen und Metamizol zu, bei denen es ebenfalls zu einer Verringerung der Abgabemengen um 7,7 t bzw. 11,2 t durch Kliniken kam, insgesamt jedoch eine Zunahme zu verzeichnen war. Damit kam es nur bei den zwei Wirkstoffen Naproxen und Paracetamol im Jahr 2020 im Vergleich zum Jahr 2017 zu einer Zunahme der Abgabemenge durch Kliniken mit ca. 0,1 t bzw. 0,6 t. Bedingt durch die Abnahme der Gesamtmenge von ASS und der Zunahme von Paracetamol, tauschten diese 2020 ihre Plätze in der Rangfolge im Vergleich zu 2017 (ASS von Platz drei 2017 auf Platz vier 2020 und Paracetamol von Platz vier 2017 auf Platz drei 2020).

Tab. 7: Arzneimittelverbrauch der Jahre 2017 und 2020 für ausgewählte Analgetika/Antiphlogistika.

Wirkstoff	Abgabemenge [in t] Jahr 2017			Abgabemenge [in t] Jahr 2020		
	Kliniken	Apotheken	gesamt	Kliniken	Apotheken	gesamt
ASS	6,5	464,9	471,4	5,1	453,7	458,8
Diclofenac	2,4	70,9	73,3	1,8	71,7	73,5
Ibuprofen	50,9	1137,8	1188,6	43,2	1168,5	1211,7
Metamizol	157,0	716,7	873,7	145,8	823,1	968,8
Naproxen	0,3	28,9	29,3	0,4	33,4	33,8
Paracetamol	25,9	411,6	437,4	26,5	449,0	475,5

4.2 Untersuchungen zur akuten Toxizität an *C. elegans*

4.2.1 Diclofenac und Kläranlagenablaufwasser

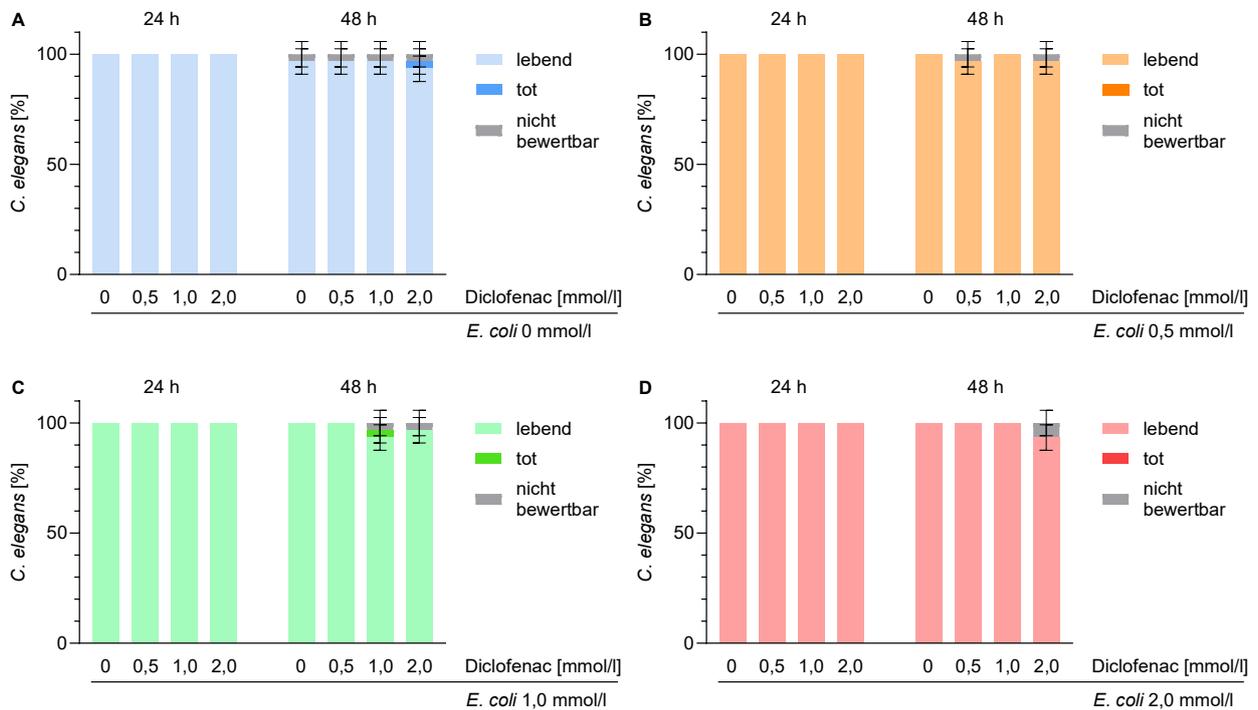


Abb. 2: Akute Toxizität *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, nach 24 h und 48 h bewertet und in lebende, tote oder nicht bewertbare Nematoden eingeteilt. Als Futter dienten *E. coli*, welche mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen konditioniert wurden. Gezeigt werden unterschiedliche Konzentrationen im NGM_K, gruppiert nach *E. coli* mit gleicher Wirkstoffkonditionierung. NGM_K 0; 0,5; 1,0 und 2,0 mmol/l Diclofenac inkubiert mit (A) *E. coli* unkonditioniert 0 mmol/l, (B) *E. coli* konditioniert 0,5 mmol/l, (C) 1,0 mmol/l, (D) 2,0 mmol/l; N = 3, n = 10.

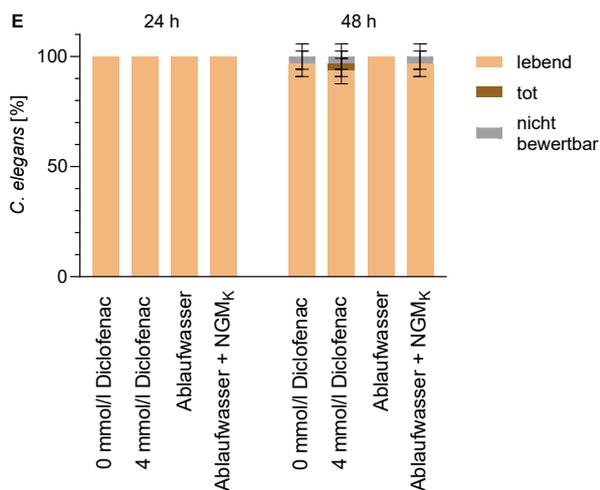


Abb. 3: Akute Toxizität *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac, Ablaufwasser und unkonditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, nach 24 h und 48 h bewertet und in lebende, tote oder nicht bewertbare Nematoden eingeteilt. Als Futter dienten unkonditionierte *E. coli*. Gezeigt werden die Kontrolle 0 mmol/l Diclofenac im NGM_K, 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O, sowie Ablaufwasser ohne und mit NGM_K-Zusatz; N = 3, n = 10.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h lebten alle Nematoden in allen untersuchten Expositionsszenarien (siehe Abb. 2 und Abb. 3). Nach weiteren 24 h kam es in drei Gruppen zum Absterben von jeweils einem Individuum. Dies betraf die Gruppe mit 1 mmol/l Diclofenac konditionierten *E. coli* und einer NGM_K-Lösung mit einer Diclofenac-Konzentration von 1 mmol/l, sowie die zwei Gruppen mit unkonditionierten *E. coli* in einer wässrigen 4 mmol/l Diclofenac-Lösung und in einer NGM_K-Lösung mit 2 mmol/l Diclofenac (Abb. 2 A, C und Abb. 3). Nicht bewertbare Nematoden traten nach 48 h in 11 von 19 Gruppen auf, einmal davon in der Kontrollgruppe (unkonditionierte *E. coli* und 0 mmol/l Diclofenac im Medium) In der Gruppe mit 2 mmol/l Diclofenac konditionierten *E. coli* und einer NGM_K-Lösung mit einer Diclofenac-Konzentration von 2 mmol/l waren zwei Individuen betroffen (Abb. 2 D), in allen anderen ein Individuum.

Es ließ sich kein Effekt von Diclofenac oder von der untersuchten Ablaufwasserprobe, sowohl im Medium als auch durch konditionierte *E. coli* als Futter, auf *C. elegans* erkennen.

4.2.2 Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol

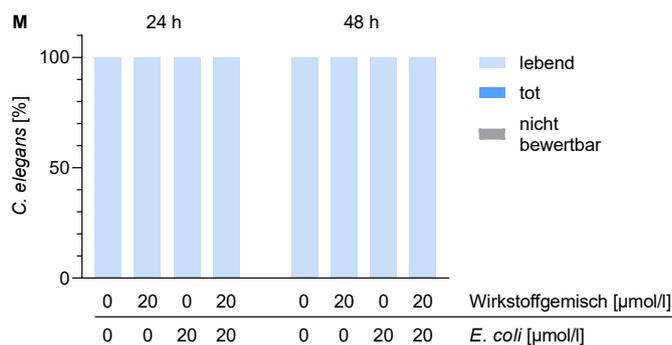


Abb. 4: Akute Toxizität *C. elegans* bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, nach 24 h und 48 h bewertet und in lebende, tote oder nicht bewertbare Nematoden eingeteilt. Als Futter dienten unkonditionierte *E. coli* und *E. coli*, welche durch eine Mischexposition von jeweils 20 µmol/l Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol konditioniert wurden. Gezeigt werden die Konzentrationen 0 und 20 µmol/l (Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Paracetamol) im NGM_K in Kombination mit konditionierten und unkonditionierten *E. coli*; N = 3, n = 10.

Bei den durchgeführten Experimenten starb innerhalb von 48 h kein Individuum oder wurde als nicht bewertbar eingestuft. Ein Effekt der Mischexposition von Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol auf *C. elegans*, sowohl im Medium als auch durch konditionierte *E. coli* als Futter, war nicht erkennbar (siehe Abb. 4).

4.3 Untersuchungen zur Lebensspanne von *C. elegans*

4.3.1 Diclofenac und Kläranlagenablaufwasser

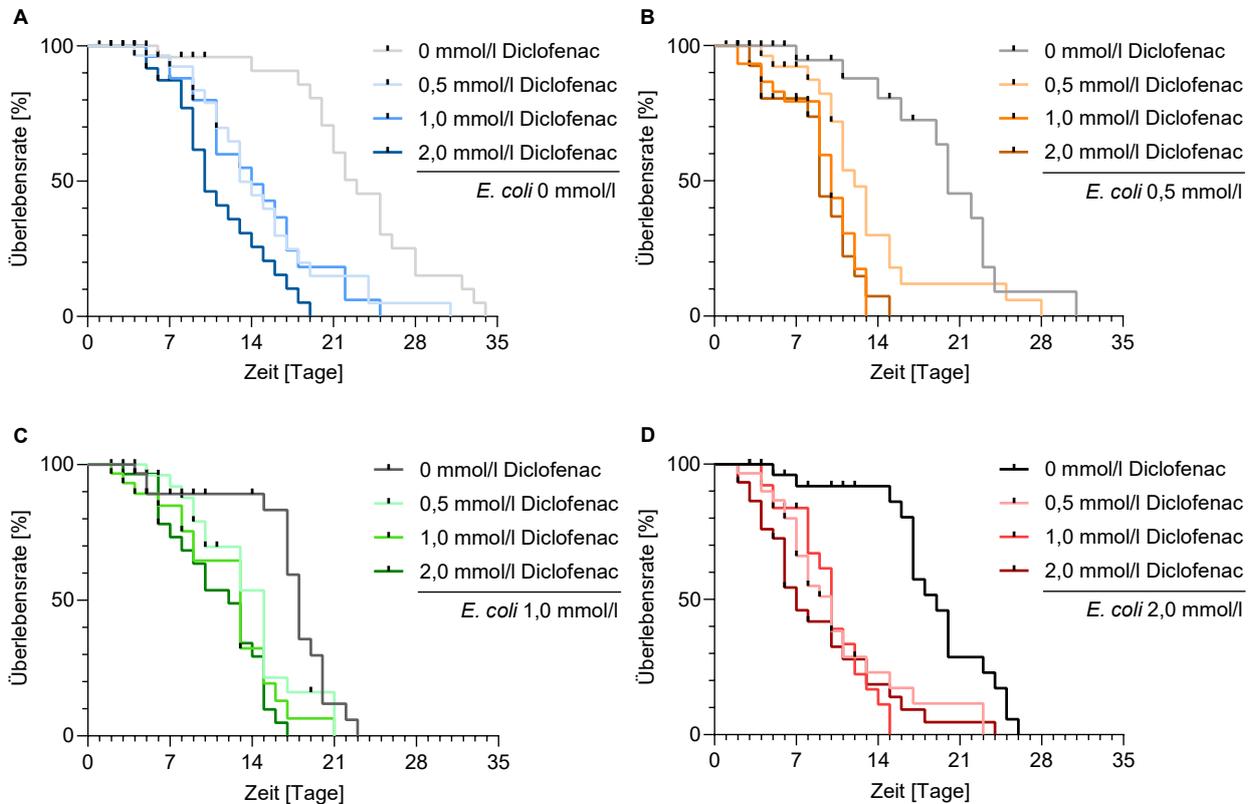


Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurve: *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Als Futter dienten *E. coli*, welche mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen konditioniert wurden. Gezeigt werden die Kaplan-Meier-Kurven der unterschiedlichen Konzentrationen im NGM_K, gruppiert nach *E. coli* mit gleicher Wirkstoffkonditionierung. NGM_K 0; 0,5; 1,0 und 2,0 mmol/l Diclofenac inkubiert mit (A) *E. coli* unkonditioniert 0 mmol/l, (B) *E. coli* konditioniert 0,5 mmol/l, (C) 1,0 mmol/l, (D) 2,0 mmol/l; N = 3, n = 10.

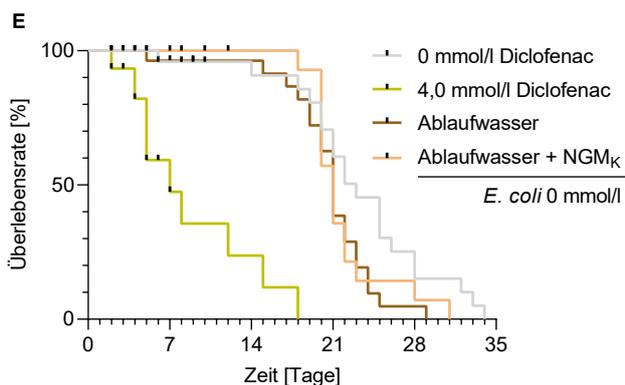


Abb. 6: Kaplan-Meier-Kurve: *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac, Abflusswasser und unkonditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Als Futter dienten unkonditionierte *E. coli*. Gezeigt werden die Kaplan-Meier-Kurven der Kontrolle 0 mmol/l Diclofenac im NGM_K, 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O, sowie Abflusswasser ohne und mit NGM_K-Zusatz; N = 3, n = 10.

In den Abbildungen 5 und 6 sind Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Generell nimmt die Aussagekraft dieser Kurven mit zunehmendem Ausscheiden von Nematoden durch Tod oder Zensur ab, da durch jenes Ausscheiden der relative Einfluss eines folgenden Ereignisses an Gewicht gewinnt und damit zunehmend größere Änderungen im Graphen verursacht. Zensierte Würmer traten überwiegend in den ersten zehn Tagen des Versuchs auf und waren mehrheitlich auf internen Schlupf und heraushängende Organe zurückzuführen.

Bei der mikroskopischen Beobachtung konnte festgestellt werden, dass die Larven, die einer höheren Wirkstoffkonzentration ausgesetzt waren, kleiner erschienen bzw. ein verzögertes Größenwachstum zeigten, und erst zwei bis drei Tage später eine mit den anderen Gruppen vergleichbare Körpergröße erreichten.

In der Tab. 8 (siehe S. 35) sind alle Analyseergebnisse geordnet nach Gruppen mit identisch konditionierten *E. coli*. Zur besseren Übersicht ist in Tab. 8 die Gruppierung farblich hinterlegt und mit einer zu Abb. 5 korrespondierenden Kennung versehen (Kennung A aus Tab. 8 entspricht den Gruppen mit unkonditionierten *E. coli*, welche auch in Abb. 5 A dargestellt sind). Außerdem ist im Falle der 16 Kombination aus Tab. 6, (siehe S. 25) deren Sortierung wieder aufgenommen: Die erste dunkel hinterlegte Zeile der Tab. 6 enthält die vier Gruppen mit unkonditionierten *E. coli*, welche Kennung A entsprechen. Die Ergebnisse des Log-Rank-Tests beziehen sich in Tab. 8 auf die jeweilige (Sub-) Gruppenkontrolle (Kennung A1, B1, C1, D1), das heißt auf die Gruppen ohne wirkstoffhaltiges Medium und identisch konditionierten *E. coli*.

Tab. 9 (siehe S. 35) zeigt dagegen zur Verdeutlichung des Effektes der durch das Futter verursacht wird, die Gruppen ohne wirkstoffhaltiges Medium mit unterschiedlich konditionierten *E. coli* (hellgrau bis schwarz in Abb. 5; Kennung A1, B1, C1, D1) sowie die Gruppe mit höchster Wirkstoffkonzentration im Medium und höchster Wirkstoffkonzentration der konditionierten *E. coli* (dunkelrot in Abb. 5; Kennung D4). Die Ergebnisse des Log-Rank-Tests beziehen sich in Tab. 9 auf die Negativkontrolle (hellgrau in Abb. 5 A; Kennung A1), das heißt auf die Gruppe ohne wirkstoffhaltiges Medium und unkonditionierten *E. coli*.

Zunächst wird der Effekt von verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen im Medium betrachtet, und dafür Gruppen mit identischer Futterkonditionierung zusammengefasst (siehe Tab. 8).

Allen Gruppen ohne Wirkstoffzusatz im Medium (Abb. 5; Kennung A1, B1, C1, D1) einschließlich der beiden Ablaufwassergruppen (Abb. 6; Kennung E2, E3) war das Verharren der Überlebensrate zwischen ca. 90-100 % in einer Plateauphase bis etwa zweieinhalb Wochen gemein. In allen weiteren Gruppen begann in der ersten Woche ein kontinuierlicher Abfall der Überlebensrate. Mit zunehmender Konzentration des gelösten Wirkstoffes im Flüssigmedium kam es in allen Gruppen zu einem früheren Todeszeitpunkt.

In den 16 Gruppen unterschiedlicher Kombinationen von Wirkstoffkonzentrationen im Medium und konditionierten *E. coli* (Abb. 5) zeigte sich unter den vier Gruppen mit identisch

konditionierten *E. coli* (Abb. 5 jeweils A, B, C, D), dass sich die Gruppe ohne Wirkstoff im Medium (0 mmol/l) (hellgrau bis schwarz) am deutlichsten von allen anderen drei Gruppen (0,5 mmol/l, 1 mmol/l, 2 mmol/l) (jeweils Farbgruppen blau, orange, grün, rot) unterschied; währenddessen die drei Gruppen mit wirkstoffhaltigem Medium weitgehend ähnliche Überlebenskurven zeigten (jeweils blau, Kennung A2-A4; orange, Kennung B2-B4; grün, Kennung C2-C4; rot, Kennung D2-D4). Die Nematoden in den Gruppen ohne Wirkstoff im Medium lebten am längsten (hellgrau bis schwarz, Kennung A1, B1, C1, D1).

Die höchste Differenz der medianen Überlebenszeit trat in der Gruppe der unkonditionierten *E. coli* (0 mmol/l) auf (Abb. 5 A). Dort sank die mediane Überlebenszeit von 23 (0 mmol/l) (Kennung A1) auf 10 Tage (2 mmol/l) (Kennung A4) und betrug damit 43 % (95 % KI; 0,23-0,81). In der Gruppe mit konditionierten *E. coli* der höchsten Konzentration (2 mmol/l) (Abb. 5 D), kam mit der Verringerung der medianen Lebensspanne von 19 (0 mmol/l) (Kennung D1) auf 7 Tage (2 mmol/l) (Kennung D4), sowohl die kleinste mediane Lebensspanne, als auch die höchste relative Reduktion auf 37 % (95 % KI; 0,20-0,68) der medianen Lebensspanne, in dieser Gruppierung vor.

Beim Vergleich der drei Gruppen aus Abb. 6 (Kennung E1-E3) zur Kontrolle (Kennung A1), war in den beiden Gruppen mit Ablaufwasser (Kennung E2, E3) eine geringfügige Reduktion der medianen Lebensspanne auf 91 % (95 % KI; 0,49-1,68 bzw. 0,46-1,81) (23 auf 21 Tage) zu beobachten. In der Gruppe mit 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O (Kennung E1) war der insgesamt stärkste Abfall der medianen Lebensspanne auf 30 % (95 % KI; 0,16-0,59), von 23 auf 7 Tage, zu verzeichnen.

Betrachtet man den Effekt, der durch unterschiedlich konditionierte *E. coli*, also durch Futter, verursacht wird, zeigte sich eine weniger starke Ausprägung. Es kam zu einer Überlagerung mit dem durch das wirkstoffhaltige Flüssigmedium ausgelösten Effekt und erschwerte eine Abgrenzung. Sichtbar wird dies in der Relation zwischen der Gruppe der höchsten Konzentration im Medium (2 mmol/l Diclofenac) mit höchster Wirkstoffkonzentration konditionierter *E. coli* (2 mmol/l) (D4) und der Gruppe ohne Wirkstoff im Medium (0 mmol/l Diclofenac) mit unkonditionierten *E. coli* (A1). Siehe dazu auch Tab. 9.

Zusätzlich zum über das Medium vermittelten Effekt – Reduktion der medianen Lebensspanne von 23 auf 10 Tage (43 %, Relation A1-A4) – führten die konditionierten *E. coli* zu einer weitergehenden Reduktion der medianen Lebensspanne von 23 auf 7 Tage und damit auf 30 % (95 % KI; 0,17-0,55) (Relation A1-D4).

Eine Überdeckung des Effekts kann in den Gruppen mit unterschiedlich konditionierten *E. coli*, jedoch ohne wirkstoffhaltiges Medium, ausgeschlossen werden und zeigte dort, dass mit zunehmender Wirkstoffkonzentration der konditionierten *E. coli* die Überlebenszeit ebenfalls abnahm (siehe Tab. 9, Relation A1 zu B1, C1, D1).

Tab. 8: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Diclofenac gruppiert nach gleich konditionierten *E. coli*.

Medium	Diclofenac im Medium [mmol/l]	<i>E. coli</i> konditioniert mit Diclofenac [mmol/l]	mediane Lebensspanne [Tage]	mediane Lebensspanne Gruppe/Kontrolle	95 % Konfidenzintervall des Verhältnisses	p-Wert Log-Rank-Test (Mantel-Cox)	Ken- nung
NGM _K	0	0	23	-	-	-	1
NGM _K	0,5	0	13	0,57	0,31-1,04	0,0002	A 2
NGM _K	1	0	14	0,61	0,32-1,14	<0,0001	3
NGM _K	2	0	10	0,43	0,23-0,81	<0,0001	4
NGM _K	0	0,5	20	-	-	-	1
NGM _K	0,5	0,5	12	0,60	0,29-1,25	0,0115	B 2
NGM _K	1	0,5	10	0,50	0,25-1,00	<0,0001	3
NGM _K	2	0,5	9	0,45	0,21-0,95	<0,0001	4
NGM _K	0	1	18	-	-	-	1
NGM _K	0,5	1	15	0,83	0,44-1,59	0,0293	C 2
NGM _K	1	1	13	0,72	0,38-1,38	0,0004	3
NGM _K	2	1	12	0,67	0,36-1,25	<0,0001	4
NGM _K	0	2	19	-	-	-	1
NGM _K	0,5	2	10	0,53	0,29-0,97	<0,0001	D 2
NGM _K	1	2	10	0,53	0,28-1,00	<0,0001	3
NGM _K	2	2	7	0,37	0,20-0,68	<0,0001	4
NGM _K	0	0	23	-	-	-	A 1
dH ₂ O	4	0	7	0,30	0,16-0,59	<0,0001	E 1
Ablauf-W	-	0	21	0,91	0,49-1,68	0,0329	E 2
Ablauf-W	-	0	21	0,91	0,46-1,81	0,1614	E 3
+ NGM _K							

Tab. 9: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Diclofenac ausgewählter Relationen.

Medium	Diclofenac im Medium [mmol/l]	<i>E. coli</i> konditioniert mit Diclofenac [mmol/l]	mediane Lebensspanne [Tage]	mediane Lebensspanne Gruppe/Kontrolle	95 % Konfidenzintervall des Verhältnisses	p-Wert Log-Rank-Test (Mantel-Cox)	Ken- nung
NGM _K	0	0	23	-	-	-	A 1
NGM _K	0	0,5	20	0,87	0,43-1,78	0,0865	B 1
NGM _K	0	1	18	0,78	0,41-1,48	<0,0001	C 1
NGM _K	0	2	19	0,83	0,44-1,56	0,0083	D 1
NGM _K	2	2	7	0,30	0,17-0,55	<0,0001	D 4

4.3.2 Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol

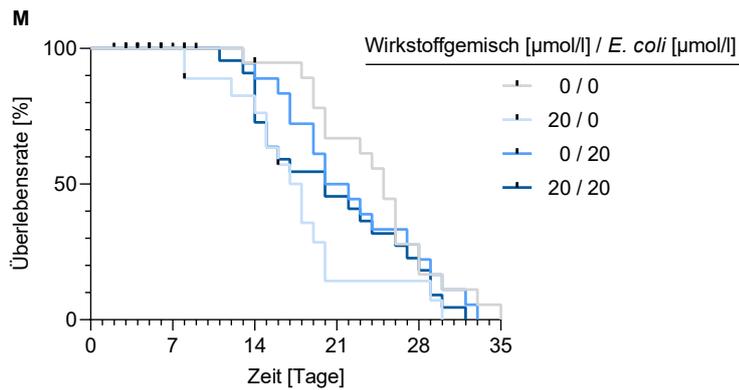


Abb. 7: Kaplan-Meier-Kurve: *C. elegans* bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Als Futter dienten unkonditionierte *E. coli* und *E. coli*, welche durch eine Mischexposition von jeweils 20 $\mu\text{mol/l}$ Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol konditioniert wurden. Gezeigt werden die Konzentrationen 0 und 20 $\mu\text{mol/l}$ (Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Paracetamol) im NGM_K in Kombination mit konditionierten und unkonditionierten *E. coli*; N = 3, n = 10.

Bei den Überlebenskurven der Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol (Abb. 7) zeigte sich ebenfalls ein Verharren der Überlebensrate bei größer 90 % über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen, um dann mehr oder weniger kontinuierlich abzufallen. Abweichend davon fiel die Überlebensrate der Gruppe mit Wirkstoffgemisch im Medium und unkonditionierten *E. coli* (hellblau, Kennung M2) bereits an Tag 8 unter 90 %. Ab Tag 14 verlief sie für drei Tage nahezu deckungsgleich mit der zweiten Gruppe wirkstoffhaltigen Flüssigmediums und konditionierten *E. coli* (dunkelblau, Kennung M4). Ab Tag 18 kam es erneut zu einem deutlichen Abfall, bevor sie nach einer längeren Plateauphase (Tag 20 bis Tag 28) wieder ähnlich der anderen Überlebenskurven verlief. Die Nematoden in der Kontrollgruppe ohne wirkstoffhaltiges Flüssigmedium und unkonditionierten *E. coli* (grau, Kennung M1) lebten am längsten und wiesen im mittleren Drittel der gesamten Überlebenszeit (siehe Abb. 7) die höchste Überlebensrate auf. Die mediane Überlebenszeit (siehe Tab. 10) verringerte sich unter Stoffeinfluss auf 70 % (95 % KI; 0,35-1,39), 84 % (95 % KI; 0,44-1,66) bzw. 80 % (95 % KI; 0,43-1,50).

Tab. 10: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Mischexposition.

Medium	Wirkstoffgemisch im Medium [$\mu\text{mol/l}$]	<i>E. coli</i> konditioniert mit Wirkstoffgemisch [mmol/l]	mediane Lebensspanne [Tage]	mediane Lebensspanne Gruppe/Kontrolle	95 % Konfidenzintervall des Verhältnisses	p-Wert Log-Rank-Test (Mantel-Cox)	Kennung
NGM _K	0	0	25	-	-	-	1
NGM _K	20	0	17,5	0,70	0,35-1,39	0,0087	M
NGM _K	0	20	21	0,84	0,44-1,61	0,4031	
NGM _K	20	20	20	0,80	0,43-1,50	0,1513	

4.4 Untersuchungen zur Lokomotion von *C. elegans*

4.4.1 Diclofenac und Kläranlagenablaufwasser

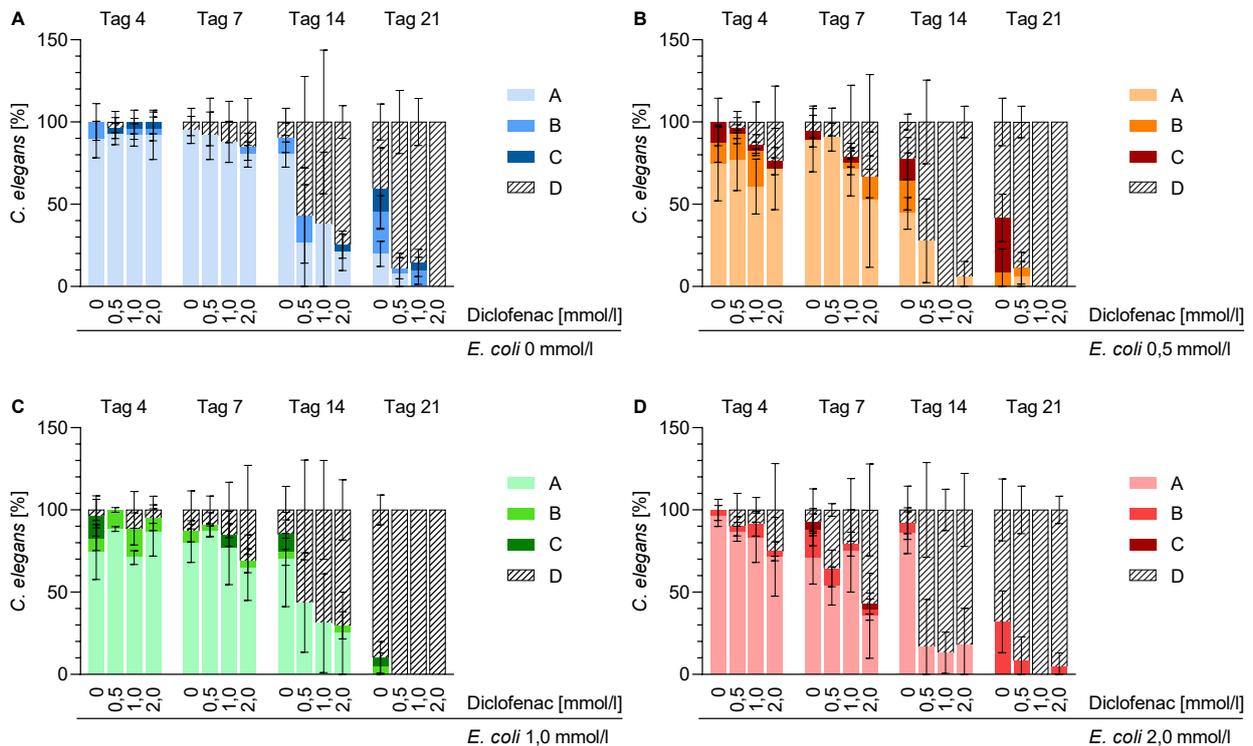


Abb. 8: Veränderungen im Bewegungsverhalten von *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende (A-C), tote (D) oder zensierte Nematoden eingeteilt. Zensierte Nematoden werden nicht dargestellt. Kategorie A: Spontanbewegung, B: Bewegung des ganzen Körpers nach Berührung, C: Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder pumpenden Pharynx nach Berührung. Als Futter dienten *E. coli*, welche mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen im NGM_K, gruppiert nach *E. coli* mit gleicher Wirkstoffkonditionierung. NGM_K 0; 0,5; 1,0 und 2,0 mmol/l Diclofenac inkubiert mit (A) *E. coli* unkonditioniert 0 mmol/l, (B) *E. coli* konditioniert 0,5 mmol/l, (C) 1,0 mmol/l, (D) 2,0 mmol/l; N = 3, n = 10.

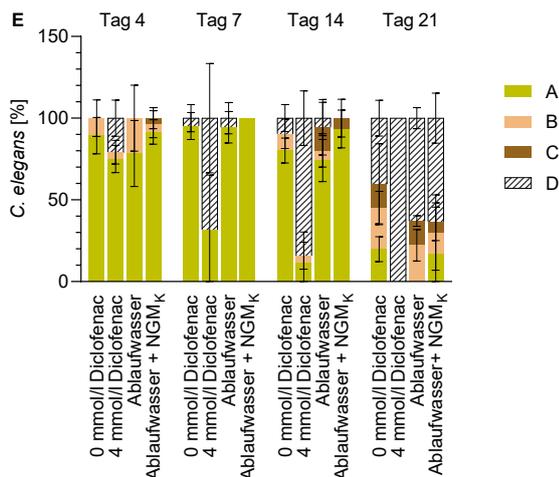


Abb. 9: Veränderungen im Bewegungsverhalten von *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac, Ablaufwasser und unkonditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende (A-C), tote (D) oder zensierte Nematoden eingeteilt. Zensierte Nematoden werden nicht dargestellt. Kategorie A: Spontanbewegung, B: Bewegung des ganzen Körpers nach Berührung, C: Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder pumpenden Pharynx nach Berührung. Als Futter dienten unkonditionierte *E. coli*. Gezeigt werden die Kontrolle 0 mmol/l Diclofenac im NGM_K, 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O, sowie Ablaufwasser ohne und mit NGM_K-Zusatz; N = 3, n = 10.

Der Lokomotionsassay ermöglicht eine Beurteilung der Beweglichkeit der Würmer je Gruppe. Bei der mikroskopischen Beobachtung der Nematoden und ihrer Beweglichkeitsbewertung sowie der Einteilung in die unterschiedlichen Kategorien waren Ungenauigkeiten vorhanden. Einzelne Nematoden aus Kategorien niedriger Beweglichkeit wurden an folgenden Tagen wieder in eine Kategorie höherer Beweglichkeit zugeordnet.

Insgesamt kam es mit fortschreitender Lebenszeit zu einer Abnahme der Beweglichkeit der Nematoden. Dies erfolgte jedoch nicht graduell gleichmäßig gestuft. Der überwiegende Teil der exponierten Nematoden verblieb bis Tag 14 in der Kategorie A. Ab Tag 21 überwogen die weniger beweglichen Nematoden in den Kategorien B und C. Abweichend vom allgemeinen Trend schienen in einigen Gruppen an Tag 7 wieder vermehrt beweglichere Nematoden vorhanden zu sein. In Abb. 8, B ist z. B. zu sehen, dass in den Gruppen mit einer Mediumkonzentration von 0 mmol/l, 0,5 mmol/l und 1,0 mmol/l Diclofenac von Tag 4 auf Tag 7 eine Zunahme der Beweglichkeit erkennbar war, ohne dass Nematoden zensiert wurden.

Exemplarisch findet sich untenstehend eine Tag-genaue Aufschlüsselung für die Kontrollgruppe und die Exposition mit höchster Wirkstoffkonzentration – 2 mmol/l Diclofenac und konditionierte *E. coli* (2 mmol/l).

Eine erhöhte Wirkstoffkonzentration schien nur einen geringen Einfluss auf eine erhöhte Anzahl gut beweglicher Nematoden zu haben. Wie in Abb. 10 deutlich wird, starben mit der höchsten Wirkstoffkonzentration und konditionierten *E. coli* nahezu alle Nematoden, ohne vorher in Kategorie B oder C eingeordnet zu sein. Die vermehrte Anzahl toter Nematoden (Kategorie D) mit zunehmender Wirkstoffkonzentration ist bereits aus Kapitel 4.3.1 bekannt. Auch in den beiden Gruppen mit Ablaufwasser (siehe Abb. 9) war nur eine geringfügige Abweichung in Form von einer höheren relativen Anzahl Nematoden in Kategorie B oder C im Vergleich zur Kontrolle festzustellen.

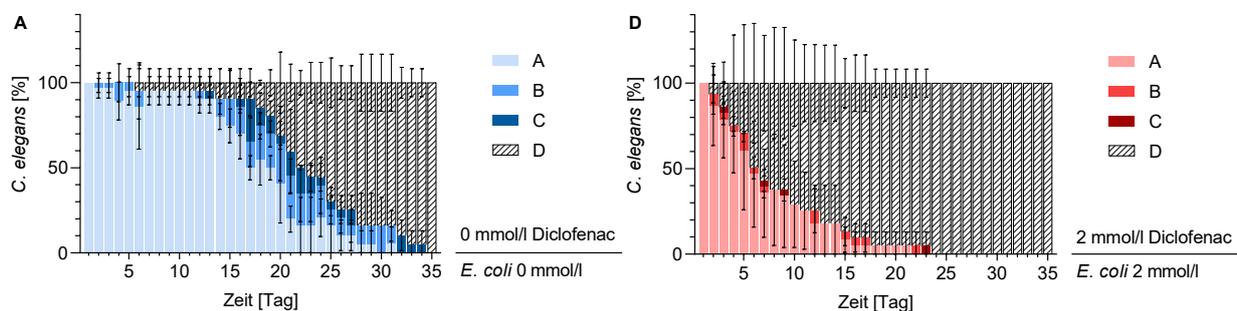


Abb. 10: Veränderungen im Bewegungsverhalten von *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten *E. coli* ausgewählter Gruppen in Tag-genaue Darstellung.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende (A-C), tote (D) oder zensierte Nematoden eingeteilt. Zensierte Nematoden werden nicht dargestellt. Kategorie A: Spontanbewegung, B: Bewegung des ganzen Körpers nach Berührung, C: Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder pumpenden Pharynx nach Berührung. Als Futter dienten *E. coli*, welche mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen konditioniert wurden. Gezeigt werden (A) NGM_K 0 mmol/l Diclofenac mit unkonditionierten *E. coli* und (D) NGM_K 2,0 mmol/l Diclofenac inkubiert mit *E. coli* konditioniert 2,0 mmol/l; N = 3, n = 10.

4.4.2 Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol

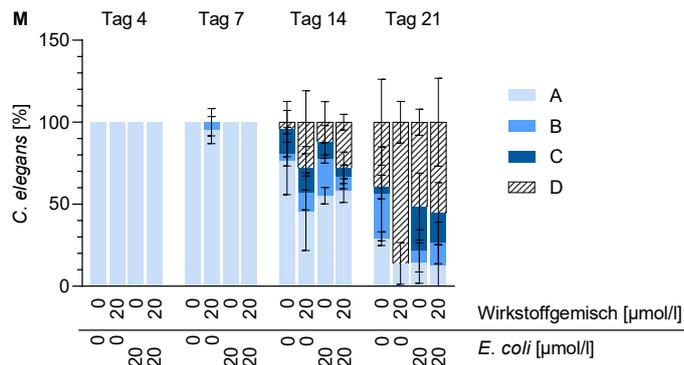


Abb. 11: Veränderungen im Bewegungsverhalten von *C. elegans* bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende (A-C), tote (D) oder zensierte Nematoden eingeteilt. Zensierte Nematoden werden nicht dargestellt. Kategorie A: Spontanbewegung, B: Bewegung des ganzen Körpers nach Berührung, C: Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder pumpenden Pharynx nach Berührung. Als Futter dienten unkonditionierte *E. coli* und *E. coli*, welche durch eine Mischexposition von jeweils 20 µmol/l Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol konditioniert wurden. Gezeigt werden die Konzentrationen 0 und 20 µmol/l (Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Paracetamol) im NGM_K in Kombination mit konditionierten und unkonditionierten *E. coli*; N = 3, n = 10.

Im Lokomotionsassay der Mischexposition war mit fortschreitender Zeit ebenfalls eine Abnahme der Beweglichkeit zu beobachten (siehe Abb. 11). Mit zunehmender Wirkstoffkonzentration im Medium und der konditionierten *E. coli* zeichnete sich die Tendenz einer verstärkten Reduktion der Beweglichkeit ab. Abweichend davon zeigte sich in der Gruppe mit wirkstoffhaltigen Flüssigmedium ohne konditionierte *E. coli* an Tag 14, trotz ähnlicher Anzahl lebender Nematoden, im Vergleich zur anderen Gruppe wirkstoffhaltigen Flüssigmediums mit konditionierten *E. coli*, eine verringerte Anzahl Nematoden in Kategorie A und ein erhöhter Anteil weniger bewegliche Nematoden in Kategorie B und C. An Tag 21 war die Reduktion in der Gruppe mit wirkstoffhaltigen Flüssigmedium ohne konditionierte *E. coli* so stark ausgeprägt, dass zwar die Anzahl der Nematoden in Kategorie A ähnlich groß war, jedoch keine Nematode in Kategorie B oder C verzeichnet war und damit die Anzahl insgesamt lebender Nematoden erheblich geringer ausfiel als in der Gruppe mit Wirkstoffgemisch im Medium und konditionierten *E. coli*.

4.5 Untersuchungen zur Nachkommenschaft von *C. elegans*

4.5.1 Diclofenac und Kläranlagenablaufwasser

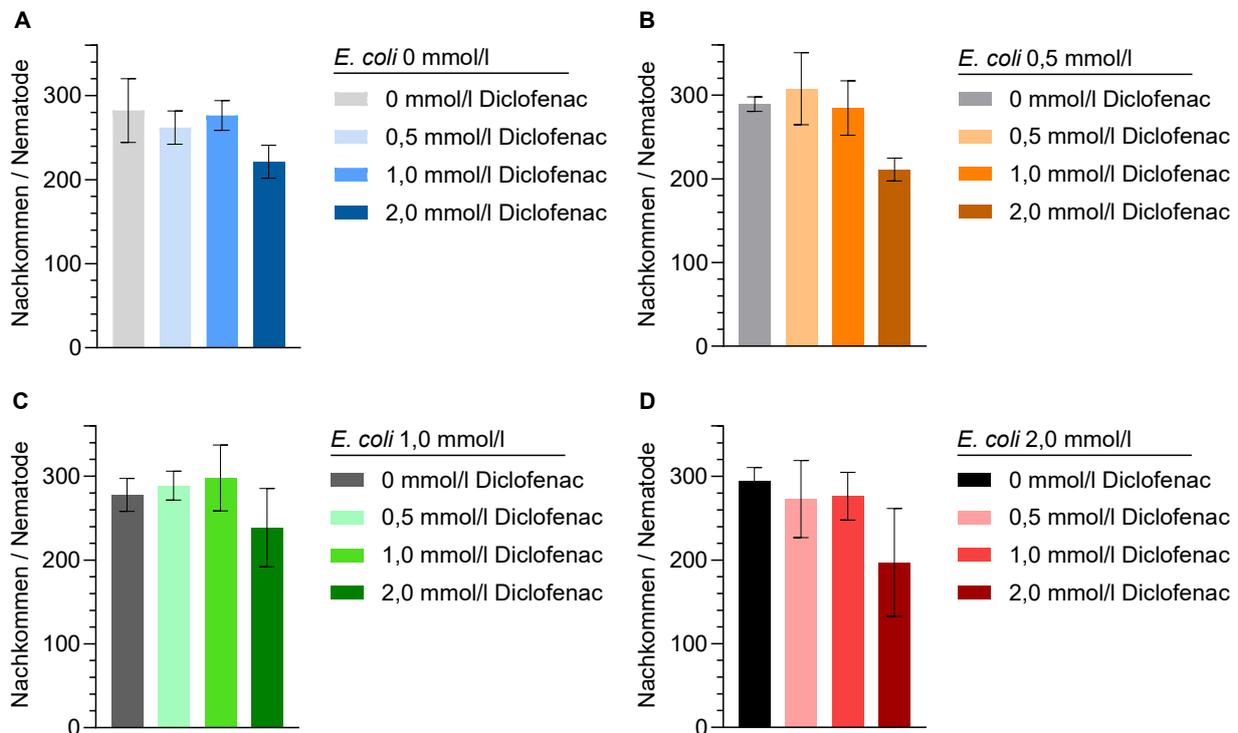


Abb. 12: Anzahl Nachkommen pro Nematode von *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Anschließend wurden sie in eine neue Kulturschale überführt und die Eier separat bis zum Auszählen der Larven inkubiert. Als Futter dienten *E. coli*, welche mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen konditioniert wurden. Gezeigt werden unterschiedliche Konzentrationen im NGM_K, gruppiert nach *E. coli* mit gleicher Wirkstoffkonditionierung. NGM_K 0; 0,5; 1,0 und 2,0 mmol/l Diclofenac inkubiert mit (A) *E. coli* unkonditioniert 0 mmol/l, (B) *E. coli* konditioniert 0,5 mmol/l, (C) 1,0 mmol/l, (D) 2,0 mmol/l; N = 3, n = 10.

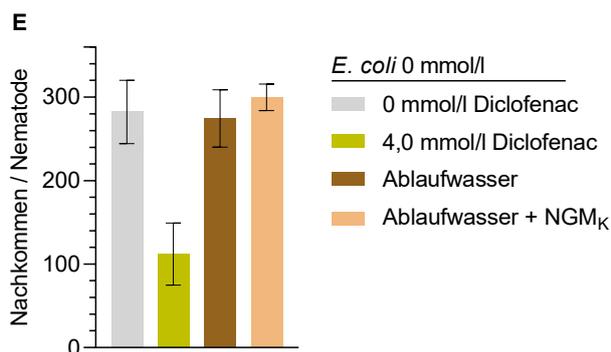


Abb. 13: Anzahl Nachkommen pro Nematode von *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac, Ablaufwasser und unkonditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Anschließend wurden sie in eine neue Kulturschale überführt und die Eier separat bis zum Auszählen der Larven inkubiert. Als Futter dienten unkonditionierte *E. coli*. Gezeigt werden die Kontrolle 0 mmol/l Diclofenac im NGM_K, 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O, sowie Ablaufwasser ohne und mit NGM_K-Zusatz; N = 3, n = 10.

Betrachtet man zunächst die Gesamtzahl der Nachkommen pro Nematode einer jeden Gruppe, einschließlich der Gruppen mit einer Exposition gegenüber der Ablaufwasserprobe (siehe Abb. 12 und Abb. 13), fällt auf, dass diese überwiegend eng beieinander, zwischen etwa 260 bis 310 Nachkommen pro Nematode, lagen. Ausnahmen davon bildeten nur die vier Gruppen höchster Wirkstoffkonzentration im Flüssigmedium (2 mmol/l Diclofenac) (Abb. 12, dunkelblau, dunkelorange, dunkelgrün, dunkelrot), die zwischen etwa 190 bis 240 Nachkommen pro Nematode aufwiesen und eine abnehmende Tendenz mit zunehmender Wirkstoffkonzentration sichtbar machen; sowie die Gruppe mit 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O (Abb. 13, grün) die mit ca. 110 Nachkommen pro Nematode deutlich weniger als die Hälfte aller anderen Gruppen aufwies.

Die spezifische Futterkonditionierung in den einzelnen Gruppen schien keinen ersichtlichen Einfluss auf die Gesamtzahl der Nachkommen zu haben.

Mikroskopisch wurden bewegungslose und in einem sehr frühen Entwicklungsstadium verharrende Larven gesehen, die nicht auszählbar waren. Je höher die Konzentration, umso mehr Larven schien dies zu betreffen.

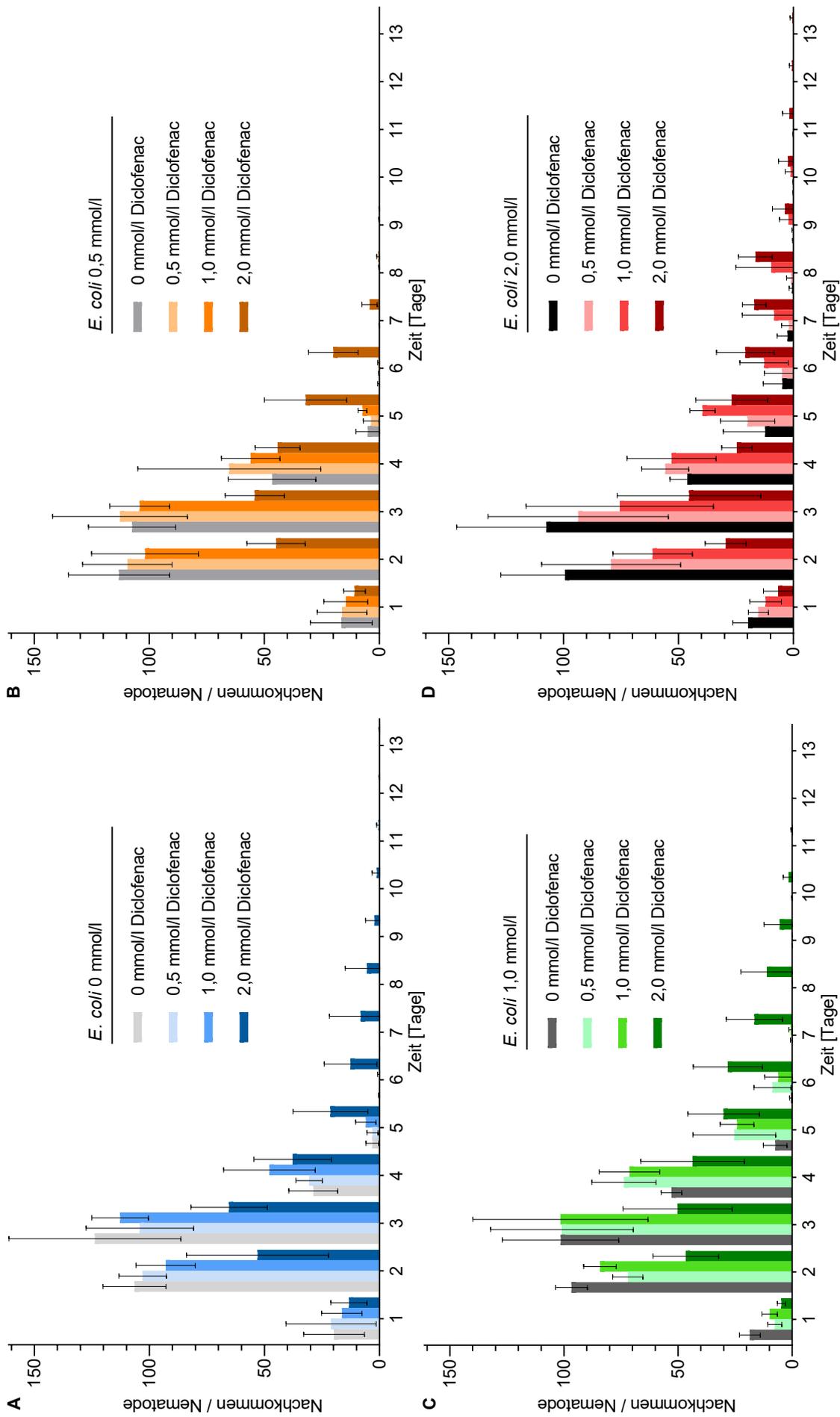


Abb. 14: Anzahl Nachkommen pro Nematode und Tag von *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac und konditionierten *E. coli*.

Altersasynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Anschließend wurden sie in eine neue Kulturschale überführt und die Eier separat bis zum Auszählen der Larven inkubiert. Als Futter dienten *E. coli*, welche mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen konditioniert wurden. Gezeigt werden unterschiedliche Konzentrationen im NGM_k, gruppiert nach *E. coli* mit gleicher Wirkstoffkonditionierung. NGM_k 0; 0,5; 1,0 und 2,0 mmol/l Diclofenac inkubiert mit (A) *E. coli* unkonditioniert 0 mmol/l, (B) *E. coli* konditioniert 0,5 mmol/l, (C) 1,0 mmol/l, (D) 2,0 mmol/l; N = 3, n = 10.

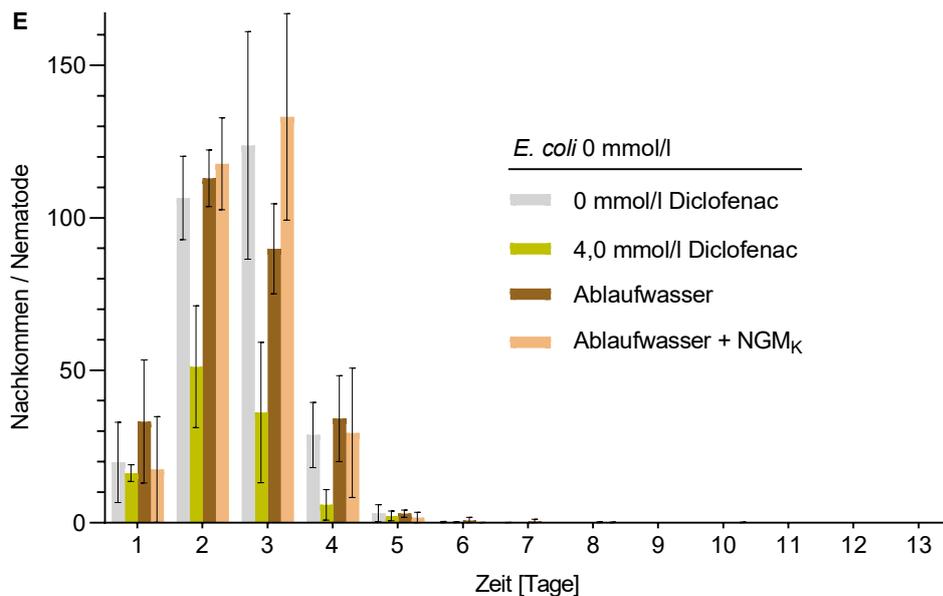


Abb. 15: Anzahl Nachkommen pro Nematode und Tag von *C. elegans* bei Inkubation mit Diclofenac, Abflusswasser und unkonditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Anschließend wurden sie in eine neue Kulturschale überführt und die Eier separat bis zum Auszählen der Larven inkubiert. Als Futter dienen unkonditionierte *E. coli*. Gezeigt werden die Kontrolle 0 mmol/l Diclofenac im NGM_K, 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O, sowie Abflusswasser ohne und mit NGM_K-Zusatz; N = 3, n = 10.

Wird die Anzahl der Nachkommen aufgeschlüsselt pro Nematode und Tag betrachtet, zeigt sich ein deutlich differenzierteres Bild.

In fast allen Gruppen traten an Tag 3 die meisten Nachkommen pro Nematode auf. Ausnahmen bildeten die Kontrollgruppe (0 mmol/l Diclofenac im Medium) der mit 0,5 mmol/l konditionierten *E. coli*-Probe (grau in Abb. 14, B), sowie die Abflusswasserprobe ohne NGM_K (braun in Abb. 15) und dH₂O mit Diclofenac 4 mmol/l (grün in Abb. 15), welche bereits an Tag 2 ihr Maximum erreichten.

Sowohl mit zunehmender Konzentration des Wirkstoffes im Medium von *C. elegans*, als auch im Kulturmedium zur Konditionierung der *E. coli*, verlängerte sich die Reproduktionsphase von *C. elegans* um mehrere Tage (Abb. 14). Im Verteilungsmuster wurde dies durch ein verringertes Maximum (Nachkommen pro Nematode und Tag) deutlich, währenddessen es gleichzeitig zu einem reduzierten Abfall der Eiablage rate kam, sodass im weiteren Verlauf, über mehrere Folgetage, eine sich verlangsamende Abnahme der Nachkommenanzahl pro Nematode und Tag sichtbar wurde.

Anfänglich lag die Anzahl der Nachkommen pro Nematode in den Gruppen ohne wirkstoffhaltiges Medium (hellgrau bis schwarz in Abb. 14) bzw. mit niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen (jeweils hellere Farbtöne) über derjenigen in den Gruppen mit höheren Wirkstoffkonzentrationen im Medium (jeweils dunklere Farbtöne). Ab Tag 4 bzw. 5 drehte sich dieses Verhältnis infolge der deutlichen Abnahme der Nachkommenanzahl in Gruppen

niedrigerer Wirkstoffkonzentrationen um, und die Anzahl der Nachkommen pro Nematode der höchsten Wirkstoffkonzentration im Medium (2 mmol/l Diclofenac) (dunkelblau, dunkelorange, dunkelgrün, dunkelrot) überstieg die der anderen Gruppen.

Der Effekt, welcher auf eine erhöhte Diclofenac-Konzentration im Medium zurückzuführen war, wird innerhalb einer Gruppierung nach identisch konditionierten *E. coli* deutlich. Bei einer Konzentration von 2 mmol/l Diclofenac im Medium (dunkelblau, dunkelorange, dunkelgrün, dunkelrot in Abb. 14) lag die Gesamtzahl der Nachkommen pro Nematode an Tag 3 um ca. die Hälfte niedriger als bei der jeweiligen Kontrollgruppe (0 mmol/l Diclofenac) (hellgrau bis schwarz).

Die reproduktive Phase endete bei allen Gruppen ohne Wirkstoffzusatz im Medium (0 mmol/l Diclofenac) (hellgrau bis dunkelgrau in Abb. 14 A, B, C), einschließlich der Gruppen mit Ablaufwasser (grün, braun in Abb. 15), an Tag 5 (mindestens eine Larve pro Nematode). Nur in der Gruppe, die zusätzlich mit konditionierten *E. coli* der höchsten Konzentration (2 mmol/l) gefüttert wurde (schwarz in Abb. 14 D), war sie um zwei Tage verlängert und endete an Tag 7.

Dagegen kam es in den Gruppen mit höheren Wirkstoffkonzentrationen im Medium zu einer Verlängerung der Reproduktionszeit. In den Gruppen mit höchster Wirkstoffkonzentration im Medium (2 mmol/l Diclofenac) endete die reproduktive Phase erst an Tag 7 (*E. coli* 0,5 mmol/l) (dunkelorange), Tag 10 (*E. coli* 0 mmol/l; 1 mmol/l) (dunkelblau, dunkelgrün) oder Tag 11 (*E. coli* 2 mmol/l) (dunkelrot) und war damit etwa um den Faktor 1,4-2 gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe (kein Diclofenac im Medium) (hellgrau bis schwarz) verlängert. Dabei wurden wiederum ausschließlich Tage mit mindestens einer Larve pro Nematode berücksichtigt. Einzelne Larven traten in mehreren Gruppen einige Tage später bis maximal Tag 13 auf (dunkelrot), womit die maximale Ausdehnung der Reproduktionszeit erreicht wurde.

Der Effekt, der durch unterschiedlich konditionierte *E. coli* verursacht wurde, hat eine schwächere Ausprägung, ist aber anhand des Vergleichs der Gruppen identischer Wirkstoffkonzentration im Medium mit unterschiedlicher Futterkonditionierung (Abb. 14) ersichtlich.

In den Gruppen wirkstofffreien Mediums (0 mmol/l Diclofenac) war die Gesamtzahl der Nachkommen pro Nematode aller Gruppen mit konditionierten *E. coli* (grau bis schwarz in Abb. 14 B-D) an Tag 3 gegenüber der Gruppe mit unkonditionierten *E. coli* (hellgrau in Abb. 14 A) um ca. 10-15 Larven pro Nematode, geringfügig verringert. Analog war in den Relationen der Gruppen mit der höchsten Wirkstoffkonzentration im Medium (2 mmol/l Diclofenac) ebenso eine Reduktion des Tagesmaximums durch konditioniertes Futter zu beobachten. In der Gruppe mit konditionierten *E. coli* (*E. coli* 2 mmol/l) (dunkelrot) fiel das Maximum an Tag 3 um ca. 20 Larven pro Nematode (Verringerung von ca. 65 auf 45) im Vergleich zu Kontrollgruppe (*E. coli* 0 mmol/l) (dunkelblau), niedriger aus.

Genau wie bei einer erhöhten Wirkstoffkonzentration im Medium führte konditioniertes Futter mit steigender Wirkstoffkonzentration zu einer Verlängerung der reproduktiven Phase. Mit einer Verlängerung um 1-2 Tage war dieser Effekt jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Im Vergleich der wirkstofffreien Gruppen (0 mmol/l Diclofenac im Medium) (hellgrau bis schwarz) untereinander verlängerte sich die reproduktive Phase von fünf (unkonditionierte *E. coli*) (hellgrau) auf sieben Tage (konditionierte *E. coli* 2 mmol/l) (schwarz). Beim Vergleich der Gruppen wirkstoffhaltigen Mediums (2 mmol/l Diclofenac) erhöhte sie sich von zehn (*E. coli* 0 mmol/l und *E. coli* 1 mmol/l) (dunkelblau und dunkelgrün) bzw. sieben (*E. coli* 0,5 mmol/l) (dunkelorange) auf elf Tage (*E. coli* 2 mmol/l) (dunkelrot).

In der Gruppe mit Ablaufwasser und NGM_K (Abb. 15) trat eine geringfügig erhöhte Anzahl von Nachkommen pro Nematode an Tag 2 und 3 auf. Ansonsten zeigte sich ein weitgehend identischer Verlauf zur Kontrollgruppe.

Die Gruppe mit Ablaufwasser ohne NGM_K (Abb. 15) wies eine vorgezogene Verteilung der Nachkommen pro Nematode auf. An Tag 1 waren in dieser Gruppe ca. zehn Larven pro Nematode mehr zu verzeichnen. Die Werte an Tag 2 entsprachen in etwa der Kontrollgruppe, während an Tag 3 ein Defizit von ca. 35 Larven pro Nematode im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen war.

Die Gruppe mit 4 mmol/l Diclofenac in dH₂O (Abb. 15) wies nach einem Tag zur Kontrollgruppe eine fast identische Anzahl von Nachkommen, an Tag 2, 3 und 4 einen deutlichen Abfall von mehr als der Hälfte der Nachkommen pro Nematode im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

4.5.2 Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol

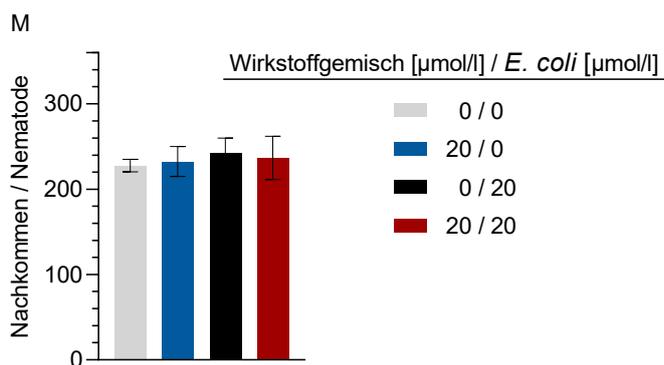


Abb. 16: Anzahl Nachkommen pro Nematode von *C. elegans* bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Anschließend wurden sie in eine neue Kulturschale überführt und die Eier separat bis zum Auszählen der Larven inkubiert. Als Futter dienen unkonditionierte *E. coli* und *E. coli*, welche durch eine Mischexposition von jeweils 20 µmol/l Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol konditioniert wurden. Gezeigt werden die Konzentrationen 0 und 20 µmol/l (Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Paracetamol) im NGM_K in Kombination mit konditionierten und unkonditionierten *E. coli*; N = 3, n = 10.

Bei der Mischexposition unterschied sich die durchschnittliche Gesamtzahl der Nachkommen pro Nematode in den Expositionsgruppen kaum und lag in einem Bereich von etwa 220 bis 240 Nachkommen pro Nematode (siehe Abb. 16). Ein Einfluss der Wirkstoffe im Medium oder durch die Konditionierung von *E. coli* konnte nicht festgestellt werden.

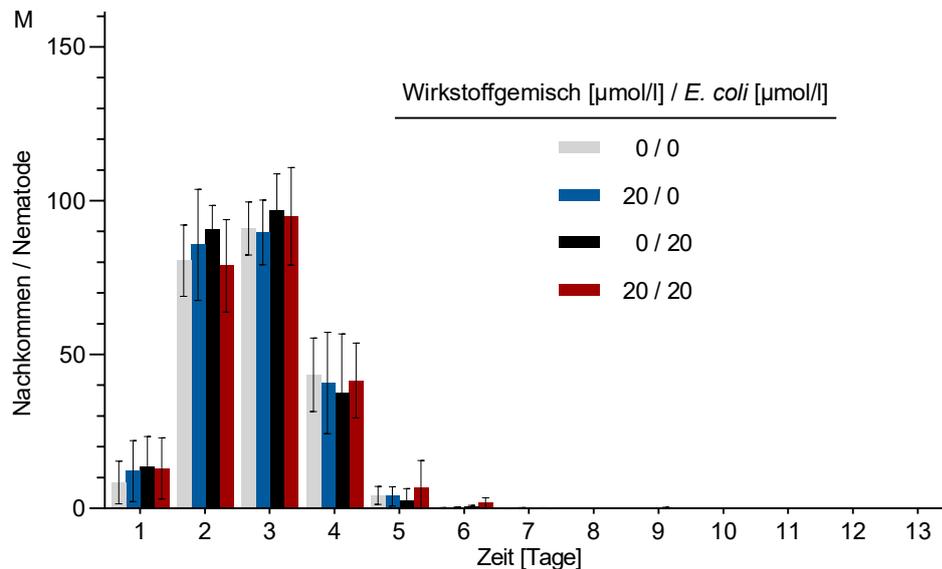


Abb. 17: Anzahl Nachkommen pro Nematode und Tag von *C. elegans* bei Inkubation mit Wirkstoffgemisch und konditionierten *E. coli*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden bei 20 °C inkubiert, täglich bewertet und in lebende, tote oder zensierte Nematoden eingeteilt. Anschließend wurden sie in eine neue Kulturschale überführt und die Eier separat bis zum Auszählen der Larven inkubiert. Als Futter dienten unkonditionierte *E. coli* und *E. coli*, welche durch eine Mischexposition von jeweils 20 µmol/l Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol konditioniert wurden. Gezeigt werden die Konzentrationen 0 und 20 µmol/l (Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Paracetamol) im NGM_K in Kombination mit konditionierten und unkonditionierten *E. coli*; N = 3, n = 10.

In der Tag-genauen Aufschlüsselung der Nachkommen pro Nematode ließ sich kein Muster erkennen, welches auf Effekte durch die Mischexposition, sowohl im Medium als auch durch die Konditionierung der *E. coli*, schließen ließ. Alle Gruppen zeigten eine gleichförmige Verteilung mit geringfügigen Änderungen zwischen den Gruppen (siehe Abb. 17).

5 Diskussion

5.1 Arzneimittelverbrauchsmenge und Kriterien für eine Umweltrisikobewertung

Eine Vielzahl von Arzneimitteln aus unterschiedlichen Substanzgruppen stehen unter Verdacht umweltrelevant zu sein oder wurden bereits als umwelttoxisch identifiziert (siehe auch Kapitel 1.3 und 1.6). Nach Angaben des Umweltbundesamtes (UBA) werden etwa 1.200 Stoffe, rund die Hälfte aller zugelassenen Humanarzneimittelwirkstoffe, als potentiell umweltrelevant eingeordnet. Das UBA beziffert die Abgabemenge dieser Stoffe für das Jahr 2012 auf etwa 8.120 t (Ebert *et al.*, 2014). Auf Schwierigkeiten die sich bei der Erfassung der Verbrauchsmengen ergeben und auf die Einführung bestimmter Schwellenwerte, um die Vielzahl der zu betrachtenden Stoffe zu reduzieren, wird später noch im Detail eingegangen. Neben der Abgabemenge sind weitere Kriterien wie z. B. Persistenz, Akkumulation oder Degradation für eine Bewertung zu beachten. Es müssen folglich sinnvolle Vorgaben bzw. Zielgrößen für eine Einteilung und Identifizierung von Arzneimitteln mit Umweltrelevanz definiert werden, die eine Priorisierung ermöglichen. Nur so können ein gezieltes Monitoring und eine Reduktion des Datendefizits für zugelassene Arzneimittel koordiniert werden. Insbesondere die mehrfach formulierte Forderung, z. B. des UBA oder SRU, nach einem einheitlichen Monographiesystem muss für einen verlässlichen Überblick forciert und etabliert werden (siehe dazu auch Kapitel 1.3).

Bekannte Disruptoren bilden vielfach den Ausgangspunkt für weiterführende Labor- oder Freilandstudien. Beispiele dafür sind Studien mit Fischen zur Wirkung von hormonell wirksamen Substanzen oder Diclofenac (Pawlowski, 2002; Triebkorn *et al.*, 2007). Außerdem liegt der Verdacht nahe, dass Substanzen aus der gleichen Wirkstoffgruppe ebenfalls durch das Teilen des gleichen oder ähnlichen Wirkmechanismus, auch ähnlich gelagerte Umweltwirkungen bei Nichtzielorganismen aufweisen.

Dies ist vor allem dann bedeutsam, wenn durch Modifizierungen am Wirkstoff eine pharmakologisch gewünschte Eigenschaft dazu führt, dass eine Umweltbewertung erschwert wird, oder das Gefährdungspotential für Umweltorganismen zunimmt. Ethinylestradiol steht z. B. trotz der geringen Verbrauchsmenge von ca. 50 t (Jahresverbrauch 2001) im besonderen Interesse der umwelttoxikologischen Untersuchungen. Das Östrogenderivat, welches zur Kontrazeption entwickelt worden ist, weist bei vergleichsweise niedriger Dosierung eine hohe Rezeptoraffinität (strukturelle Veränderung im Vergleich zu Estradiol) und zusätzlich eine hohe Umweltpersistenz auf. Gerade die hohe Rezeptoraffinität ist pharmakologisch erwünscht, da sie eine geringere Einzeldosis erlaubt und mit der verringerten Abbaubarkeit länger als Wirkstoff, und nicht als Metabolit, im Organismus zur Verfügung steht. Dies trifft auf den Zielorganismus, in diesem Fall den Menschen, genauso wie auf Nichtzielorganismen in der Umwelt zu. Durch den hohen Anteil unverändert

ausgeschiedenem Ethinylestradiol von ca. 85 % der Dosis (welcher z. B. bei Ibuprofen nur ca. 1 % beträgt), vergrößert sich entsprechend der relative Einfluss der Ausgangssubstanz in der Umwelt nach der Arzneimittelanwendung. Auch innerhalb einer Wirkstoffgruppe können erhebliche Differenzen auftreten; so wird bspw. für das Analgetikum Diclofenac eine unverändert ausgeschiedene Dosis von ca. 70 % angegeben. Dies entspricht dem 70-fachen im Vergleich zum Analgetikum Ibuprofen. Bei Metamizol werden dagegen ausschließlich Metaboliten und keine Muttersubstanz ausgeschieden (Gelbe Liste, 2021; SRU, 2007, Tz 48, 58, Tab. 1; Huschek und Krengel, 2003).

Für eine Umweltrisikobewertung können die Metaboliten der Muttersubstanz zugeschlagen werden. Da über die Metaboliten (wie z. B. denen von Ibuprofen) und Transformationsprodukte oftmals kaum etwas bekannt ist (SRU, 2007, Tz. 16), führt dies zu weiteren Unsicherheiten bei der Bewertung der Muttersubstanz. Transformationsprodukte könnten so über- oder unterbewertet werden.

Die Verbrauchsmenge bietet sich als eine einfache und leicht vergleichbare Kenngröße an, die häufig als Einteilungskriterium Verwendung findet. Im Chemikalienrecht gelten bspw. alle Stoffe mit einer Verbrauchsmenge von mehr als 1 t pro Jahr als registrierungspflichtig und führen zu Informationspflichten der Hersteller bzw. Importeure. Daten zu Eigenschaften und Verwendung, eine Gefahren- und Risikobeurteilung, sowie ggf. die Risikobeherrschung werden in einem Registrierungsdossier der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) vorgelegt. Alle Hersteller bzw. Importeure müssen für den gleichen Stoff eine gemeinsame Registrierung nach dem Grundsatz "ein Stoff, eine Registrierung" vornehmen. Explizit ausgenommen sind Stoffe die durch andere Rechtsvorschriften einer Regelung unterliegen, wie z. B. radioaktive Stoffe oder Arzneimittel (ECHA, 2021). Neben der Verbrauchsmenge eines Stoffes von > 1 t pro Jahr als Grenzwert, kann auch das Überschreiten einer Stoffmengenkonzentration, z. B. > 0,1 µg/l im Trinkwasser, zu weiteren Maßnahmen und einer Nachverfolgung führen (siehe auch Kapitel 1.3). Allein durch den Verdünnungseffekt der auftritt, nachdem die Stoffe in die Umwelt gelangten, wird die Nachweisbarkeit erheblich erschwert, da die analytischen Grenzen erreicht oder unterschritten werden können. Mögliche Nachweise sind so messtechnisch nicht oder nur unter erheblichem Aufwand möglich; stattdessen muss auf Verbrauchs- und Verteilungsannahmen und den daraus resultierenden Konzentrationsberechnungen zurückgegriffen werden.

Obwohl die Abgabemenge häufig als Hauptbewertungskriterium genutzt wird, sind die eingeführten Grenzwerte trotz ähnlicher Fragestellungen nicht einheitlich. Z. B. wird im Chemikalienrecht (siehe oben) eine Menge > 1 t verwendet, in der Studie von Huschek und Krengel (2003) wurde eine Menge > 5 t festgelegt. Außerdem kann oft nicht auf eine einheitliche bzw. valide Datengrundlage zum Verbrauch zurückgegriffen werden, da z. B. keine Berichtspflichten zu Verbrauchsmengen von Arzneimitteln bestehen.

Der Fokus allein auf der Abgabemenge wird dabei einer umfassenden Betrachtung nicht gerecht. Die Grenzwerte dienen in der Regel dazu eine Vielzahl von Stoffkandidaten zu reduzieren, die im Anschluss genauer betrachtet werden sollen. Oftmals fehlt jedoch eine genauere Begründung für den Ausschluss der Stoffe unterhalb des Grenzwertes. Ähnliches gilt für Stoffmengenkonzentrationen. Dies wird nochmals deutlich, wenn man z. B. den Unterschied in der Abgabemenge von Ethinylestradiol (50 kg im Jahr 2001) und Ibuprofen (345 t im Jahr 2001) betrachtet (Huschek und Krenzel, 2003). Wie bereits oben dargestellt, ist Ethinylestradiol sehr wohl umwelttoxisch relevant, liegt aber deutlich unter 5 t oder 1 t Jahresverbrauch.

Huschek und Krenzel (2003) fertigten eine Studie für das UBA an, welche sich auf Daten von IMS *Health* und dem Wissenschaftlichen Institut der allgemeinen Ortskrankenkassen stützt. In dem Forschungsbericht „Mengenermittlung und Systematisierung von Arzneimittelstoffen im Rahmen der Umweltprüfung von Human- und Tierarzneimitteln gemäß § 28 AMG“ von Huschek und Krenzel (2003) wird anhand des Leitfadens der europäischen Arzneimittelbehörde eine stufenweise Bewertung der Arzneimittelrückstände zur Abschätzung des Umweltrisikos vorgenommen. Klassischerweise beruht die Umweltbewertung auf einer Risikoabschätzung unter Berücksichtigung der vier Elemente: Gefährdungserkennung, Gefährdungscharakterisierung, Expositionsabschätzung und Risikocharakterisierung.

Die in der Studie von Huschek und Krenzel (2003) vorgenommene Abschätzung des Umweltrisikos richtet sich nach den Forderungen der europäischen Arzneimittelbehörde und wird in zwei Phasen durchgeführt. Phase I umfasst die Expositionsabschätzung der Wirkstoffe in den einzelnen Umweltkompartimenten Luft, Boden und Wasser. Es sollen direkte und indirekte Eintragswege, sowie deren zeitlicher Verlauf berücksichtigt werden, bspw. auch der Eintrag über Klärschlamm in den Boden. In der Regel wird davon ausgegangen, dass der Eintrag in Boden und Luft unbedeutend und der Eintragsweg über Wasser entscheidend ist. Ausnahmefälle können hingegen z. B. Emissionen durch Inhalationsnarkotika in die Luft sein. Zur Beurteilung werden auch die physikochemischen Eigenschaften (wie etwa Löslichkeit und Dissoziationskonstante für Säuren und Basen), Metabolisierung, Gebrauch und Anwendung, Ausscheidung und Konzentrationen im Urin und Stuhl, sowie Abbaubarkeit (z. B. Hydrolyse, Fotolyse, Oxidation) und Entsorgungspraktiken herangezogen.

Für das Wasserkompartiment wird die erwartete Umweltkonzentration (PEC) am Zulauf zum Oberflächenwasser (in der Regel Abläufe der Kläranlagen) der nichtmetabolisierten, aktiven Substanz anhand einer Formel abgeschätzt bzw. berechnet. In diese Berechnung geht die erwartete Abgabemenge pro Jahr für ein umschriebenes geographisches Gebiet, die Rückhalterate durch Kläranlagen, die Bevölkerungszahl des Gebietes, das

Abwasservolumen pro Kopf und der Verdünnungsfaktor im Oberflächenwasser (durchschnittlich Faktor 10) ein. In der Regel ist die Betrachtung der aktiven Substanzen ohne Metaboliten ausreichend. Dennoch können auch aktive Substanzen nach der Biotransformation auftreten und werden dann entsprechend der Muttersubstanz zugeordnet, um unter Einbeziehung der Ausscheidungsraten eine feinere Abstufung der PEC zu erreichen. Nur wenn in der Expositionsabschätzung in Phase I der festgelegte Schwellenwert der PEC von 0,01 µg/l überschritten wird, schließt sich in Phase II eine Wirkungsanalyse an. Für Stoffe mit bekannten oder besonderen Umweltwirkungen, wie z. B. Hormonen oder genotoxischen Stoffen, sollte eine niedrigere PEC in Phase I festgelegt werden.

Abweichend davon werden für Tierarzneimittel andere Grenzwerte (1 µg/l für Wasser und 100 µg/kg für Boden) genutzt und Ausnahmeregelungen angenommen. Anhand eines mehrstufigen Entscheidungsbaumes erfolgt eine Bewertung der einzelnen Kriterien, die zur Weiterleitung in Phase II führen.

Für die Wirkungsanalyse (Phase II) wird der Wert ermittelt, bei dem keine Wirkung in der Umwelt zu erwarten ist (PNEC). Dafür werden Standardtests zur akuten Toxizität verwendet. Adverse oder indirekte Wirkungen wie z. B. Enzyminduktion, Resistenzen oder Reduktion der Fertilitätsraten finden ebenso Beachtung. Anhand der niedrigsten ermittelten Werte von bspw. mittlerer letaler Konzentration (LC_{50}), mittlerer wirksamer Konzentration (EC_{50}) oder höchster Stoffkonzentration, bei der kein Effekt auftritt (NOEC), wird durch Aufschlag eines Sicherheitsfaktors eine PNEC abgeleitet. Der Sicherheitsfaktor soll Unsicherheiten abbilden, die durch Extrapolieren der akuten Toxizität auf chronische Toxizität bestehen (Faktor 10), die durch unterschiedliche Empfindlichkeiten verschiedener Spezies (Faktor 10) oder innerhalb der gleichen Spezies bestehen (ebenfalls Faktor 10). Wenn Daten zu drei aquatischen Organismen vorliegen, kommt in der Regel ein Sicherheitsfaktor von 1.000 zur Anwendung. Die niedrigste ermittelte Effektkonzentration wird dafür durch den Sicherheitsfaktor zur Ermittlung der PNEC geteilt. Anschließend wird ein Quotient aus erwarteter Umweltkonzentration (PEC) und Konzentration, bei der kein Effekt erwartet wird (PNEC) gebildet. Ist der Quotient $PEC : PNEC > 1$, werden zur genaueren Betrachtung ausführliche Untersuchungen an Modellorganismen notwendig.

Um die Anzahl der Arzneimittel zu reduzieren, die einer Umweltexpositionsabschätzung zugeführt werden sollen, wurden Stoffe mit weniger als 5 t Jahresverbrauch nicht berücksichtigt. Physiologische Stoffe, z. B. Vitamine, Mineralien, Aminosäuren, Kräuter, Bakterien, Enzyme, endogene Proteine, homöopathische Produkte und Schwermetalle wurden ebenfalls ausgeschlossen. Trotz ihrer geringen Verbrauchsmenge von deutlich unter 5 t pro Jahr wurde je ein Vertreter aus der Gruppe der Zytostatika und Hormone für eine Berechnung der PEC herangezogen. Als reduzierte Auswahl verblieben 111 Arzneimittel (Huschek und Kregel, 2003).

Nachfolgende Studien, bspw. „Bewertung der Umweltrelevanz von Arzneistoffen“ oder „Monitoring von Arzneimitteln in der Umwelt“, nutzen diese erarbeitete Daten- und Entscheidungsgrundlage und beziehen sich in weiten Teilen auf Huschek und Krenzel (Bergmann *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2011).

Das UBA hat ebenfalls in seiner Einteilung als Hauptkriterium die Abgabemenge herangezogen und alle Stoffe größer 80 t Jahresverbrauch in seine Betrachtungen mit besonderem Interesse aufgenommen. Darunter finden sich unter anderem Stoffe wie Metformin, Metoprolol und Amoxicillin. Die vom UBA verwendeten Daten beziehen sich auf das Jahr 2012. Wie bereits in Kapitel 1.2 bzw. 1.5 dargestellt, bilden Analgetika bzw. Antiphlogistika eine dominante Gruppe unter den Humanarzneimittelwirkstoffen mit möglicher Umweltrelevanz und einer jährlichen Abgabemenge von über 80 t. In der Auflistung des UBA sind aus dieser Gruppe ASS, Diclofenac, Ibuprofen, Metamizol und Paracetamol zu finden (Ebert *et al.*, 2014). Diclofenac ist nicht nur deutschlandweit, sondern auch EU- und weltweit von großer Bedeutung. Im Bericht des UBA „*Pharmaceuticals in the Environment*“ aus dem Jahr 2019 wird der weltweite Verbrauch von Diclofenac, inklusive der Tierarzneimittel, näherungsweise mit 940 t pro Jahr angegeben. Der Verbrauch in Europa wird mit ca. 180 t und für Deutschland mit ca. 82 t beziffert. Diclofenac befand sich zwischenzeitlich als einziges Schmerzmittel auf der EU-Beobachtungsliste für Gewässer. Diese enthält maximal 14 Stoffe oder Stoffgruppen, bei denen Überwachungsprobleme vorliegen. Maximal zwei Aktualisierungszeiträume, was vier Jahren entspricht, darf ein Stoff gelistet bleiben. Das UBA hat außerdem in seiner 2019 veröffentlichten Analyse 19 Arzneimittel identifiziert, die in allen fünf UN-Regionen nachweisbar sind, und damit besondere Aufmerksamkeit erreichen. Auch hier ist die prominente Stellung der COX-Hemmer auffällig. Es handelt sich um die sieben Analgetika ASS, Diclofenac, Ibuprofen, Indometacin, Ketoprofen, Naproxen und Paracetamol. Die übrigen zwölf Stoffe sind sechs Antibiotika/antibakterielle Mittel (Ciprofloxacin, Sulfamethazin, Sulfamethoxazol, Triclocarban, Triclosan, Trimethoprim), vier Hormone (17-alpha-Ethinylestradiol, 17-beta-Estradiol, Estriol, Estron), ein Antikonvulsivum (Carbamazepin) und ein Cholesterinsenker (Clofibrinsäure) (UBA, 2019; UBA, 2020b).

Die Ermittlung von validen und vollständigen Verbrauchsdaten stellt eine große Herausforderung dar, da wenige Quellen verfügbar sind. Im Folgenden werden die Zusammenhänge und mögliche Verknüpfungen der Daten dargestellt und eingeordnet.

Jährlich kommt es zu Änderungen der Verbrauchsmengen der einzelnen Arzneimittel bzw. Präparate. Die Gründe dafür sind vielfältig und können bspw. die Einführung neuer Arzneimittel mit verbessertem Risiko-Nutzen-Verhältnis, geänderte Richtlinien für Standardmedikationen, neue Studienergebnisse, Zulassungs- oder Indikationseinschränkungen sowie

Arzneimittelkosten sein. Erschwerend kommt hinzu, dass in den einzelnen Publikationen die Datengrundlage ebenfalls heterogen und bezüglich ihrer Vollständigkeit unklar ist. Für Tierarzneimittel ist die Datenlage noch geringer als bei Humanarzneimitteln und führt zu erheblichen Schätzungsunsicherheiten. In einigen Bereichen wird davon ausgegangen, dass der Schätzfehler, etwa bei Kleintieren bis zu 80 % beträgt, oder dass u. a. durch Arzneimittelbeschaffung übers Internet und Umwidmung von Arzneimitteln oder Chemikalien z. B. bei Zierfischen nur etwa 10 % der Arzneimittelanwendung auf legalem Weg erfolgt. Die einzelnen Datenpunkte verschiedener Jahre lassen sich daher, selbst innerhalb einer Quelle, wie etwa dem jährlich erscheinenden Arzneimittelreport, nur bedingt vergleichen. Der Arzneimittelreport „beruht auf der Datenbasis des GKV-Arzneimittelindex, die 2002 von einer 4-Promille-Stichprobe auf eine Vollerhebung umgestellt wurde. (...) Es kann daher zu unterschiedlichen Ergebnissen – insbesondere für das Jahr 2001 – in älteren und neueren Publikationen kommen, die zum einen durch die unterschiedlichen Datengrundlagen, zum anderen durch eine aktuellere und vollständigere Arzneimittelklassifikation zustande kommen“ (Schwabe und Paffrath, 2015, S. 1110; Huschek und Kregel, 2003).

Trotz alledem stellt der jährlich veröffentlichte Arzneimittelreport eine konstante Datengrundlage dar, anhand derer auch ein Gesamttrend für den Humanarzneimittelmarkt abgeschätzt werden kann. Dieser umfasst alle Verordnungen auf Kosten der gesetzlichen Krankenversicherung. Die Verordnungen u. a. für Privatpatienten (Bevölkerungsanteil etwa 10 %), sowie rezeptfrei erhältliche Arzneimittel (OTC-Produkte) sind dort nicht abgebildet. Der Arzneimittelreport nutzt als Vergleichsgröße die definierte Tagesdosis (DDD). Diese ist eine statistische Messgröße und dient dem Vergleich der verwendeten Arzneimittel in der Therapie, kann jedoch in eine Masseangabe umgerechnet werden. Im Arzneimittelreport von Schwabe und Paffrath (2015, S. 1111) heißt es: „Die definierte Tagesdosis basiert auf der Menge eines Wirkstoffes bzw. eines Arzneimittels, die typischerweise für die Hauptindikation bei Erwachsenen pro Tag angewendet wird. Für Arzneimittel, die ausschließlich bzw. vornehmlich für die Anwendung bei Kindern vorgesehen sind, werden für die Daten der vorliegenden Publikation durchschnittliche Kinderdosen eingesetzt. (...) Innerhalb einer therapeutischen Gruppe soll nach Möglichkeit eine Äquivalenz der Wirkungsstärke (*equipotency*) angestrebt werden. (...) Wenn Unterschiede zwischen stationärer und ambulanter Behandlung bestehen, werden in der Regel die Angaben für die ambulante Dosierung verwendet“. Abweichungen können bei Kombipräparaten auftreten, bei denen eine Standarddosierung im Sinne einer durchschnittlichen Dosierungsempfehlung angegeben wird, falls die Wirkstoffmenge sich als Vergleich nicht eignet (Schwabe und Paffrath, 2015). Erschwerend muss daher beachtet werden, dass die DDD für den gleichen Wirkstoff unter Umständen auch in verschiedenen Indikationen und Kombipräparaten abweichen kann. Die möglicherweise erhebliche Spanne der DDD wird, wie bereits in Kapitel

1.5 erwähnt, am Beispiel ASS deutlich, welches als Thrombozytenaggregationshemmer typischerweise mit einer DDD von 100 mg (ATC-Code B01AC06) und als Analgetikum mit einer DDD von 3.000 mg (ATC-Code N02BA01) Anwendung findet (DIMDI, 2020; Schwabe und Ludwig, 2020).

Diclofenac wies jahrelang ein konstantes Verordnungsvolumen auf, unterliegt allerdings seit einigen Jahren einem Verordnungsrückgang. Dahinter folgte in der Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika lange Zeit auf dem zweiten Platz Ibuprofen mit jährlichen Verordnungszunahmen. Im Jahre 2011 wurden in etwa die gleiche Menge an definierten Tagesdosen (jeweils ca. 423 Mio. DDD) Diclofenac und Ibuprofen verordnet, im darauffolgenden Jahr 2012 erstmals deutlich mehr Dosen Ibuprofen (456 Mio. DDD) als Diclofenac (395 Mio. DDD). Die definierten Tagesdosen unterscheiden sich jedoch um das Zwölfwache. Diclofenac (ATC-Code M01AB05) hat eine definierte Tagesdosis von 0,1 g, Ibuprofen (ATC-Code M01AE01) von 1,2 g (Schwabe und Paffrath, 2015, S. 502; DIMDI, 2020).

Vergleicht man die Mengenangaben die von IMS *Health* ermittelt wurden mit den errechneten Mengen auf Basis der DDD des Arzneimittelreports (Tagesdosis multipliziert mit Verbrauchsmenge) wird eine deutliche Lücke sichtbar. Der Unterschied beruht wahrscheinlich im Wesentlichen auf einer Untererfassung der Mengen durch den Arzneimittelreport (Ausschluss von Privatrezepten, OTC-Produkte, etc.) und einer anderen Berechnungsgrundlage.

Im Jahr 2001 wurden noch ca. 85,8 t Diclofenac (Daten IMS *Health*) verbraucht und zu Lasten der GKV 424,7 Mio. DDD (entspricht ca. 42,5 t) verordnet. Analog dazu wurden 344,9 t Ibuprofen (Daten IMS *Health*) verbraucht und im Arzneimittelreport 140,3 Mio. DDD (entspricht ca. 168,4 t) ausgewiesen (Huschek und Kregel, 2003; Schwabe und Paffrath, 2003, 258, 259).

Der Trend, dass die Verbrauchsmengen von Ibuprofen kontinuierlich zunehmen und die von Diclofenac abnehmen, führte dazu, dass Ibuprofen im Jahr 2020, nach den in dieser Arbeit vorliegenden Studiendaten (siehe Tab. 7), im Humanarzneimittelmarkt mit Abstand die größten Verbrauchsmengen unter den abgefragten Analgetika einnimmt. Im Vergleich der Daten von IMS *Health* mit denen von IQVIA (Nachfolgeunternehmen von IMS *Health*) des Jahres 2001 zu 2020 hat sich die Menge von Ibuprofen knapp vervierfacht (344,9 t auf 1.211,7 t). Diclofenac kommt im Jahr 2020 auf eine Gesamtverbrauchsmenge von 73,5 t und ist damit im Vergleich zum Jahr 2001 (85,8 t) um ca. 14 % zurückgegangen (Huschek und Kregel, 2003; IQVIA, 2021a).

Auf die Unsicherheiten in Bezug auf valide Daten und deren Hochrechnungen, insbesondere von OTC-Präparaten und Krankenhausverordnungen, verweist auch der Bericht für den Deutschen Bundestag (Klauer *et al.*, 2020). In diesem Bericht wird die wirkstoffbezogene Mengenermittlung durch IMS *Health* hervorgehoben, die den Arbeiten von Huschek und

Krengel (2003) sowie Ebert *et al.* (2014) zugrunde liegen. IQVIA ermöglicht mit der Zusammenstellung „Marktstruktur rezeptfreier Produkte aus Apotheken in 2020“ weitere Einblicke in den OTC-Gesamtmarkt. Danach wurden 2020 1,23 Mrd. Packungen rezeptfreier Produkte abgegeben. Dies entspricht im Gesamtmarktvergleich (mit rezeptpflichtigen Produkten) einer Menge von 61 %. Unter den rezeptfreien Produkten wurden ca. 58 % von Arzneimitteln eingenommen, die restlichen 42 % verteilten sich auf Nichtarzneimittel wie etwa Produkte des medizinischen Sachbedarfs, Gesundheitsmittel oder Körperpflegeprodukte (IQVIA, 2021b).

Zur Verbesserung der Datenlage wurde 2021 eine Sonderstudie bei IQVIA beauftragt. Als Nachfolgeunternehmen von IMS *Health* verspricht dies eine bessere Vergleichbarkeit mit bereits vorhandenen Daten. Die Vollständigkeit der Verbrauchsdaten ist auf Humanarzneimittel im Apotheken- und Kliniksektor limitiert und umfasst keine Daten zum Verbrauch bzw. Eintrag aus anderen Quellen wie z. B. der Bundeswehr, Justizvollzugsanstalten, Tierarzneimittel oder Biozide (siehe dazu auch Kapitel 3.2.1). Allerdings sind der insbesondere für rezeptfrei erhältliche Analgetika relevante OTC-Markt und der Klinikmarkt enthalten. Der Anteil im ambulanten Sektor dominiert den Gesamtverbrauch mit über 90 % des Arzneimittelverbrauches für die Wirkstoffe ASS, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol sowie für Metamizol mit über 80 % (siehe Ergebnisse Studie Kapitel 4.1).

Trotz einer sehr viel breiter aufgestellten Datengrundlage, sind auch durch die spezielle Aufbereitung und Zählweise der Einzeldosen in der IQVIA-Sonderstudie Unsicherheiten in Kauf zu nehmen. Da Krankenhäuser an die Patienten keine Packungen abgeben, sondern Einzeldosen, ermöglicht allerdings gerade die Aufbereitung in Zähleinheiten den Klinik- und Apothekensektor gemeinsam zu betrachten und zu vergleichen. Aus diesem Grund beruht die Einzeldosis einer Zähleinheit (ZE) auf einer rechnerischen Splittung der Gesamtpackung in Einzeldosen. Deutlich sichtbar wird die Unschärfe für die in der Datenbank eingepflegten, herstellerseitigen Angaben zur Einzeldosis, etwa für Flüssigkeiten oder Gele, die als Mindestgröße oder Durchschnittsgröße aufgefasst werden können.

Beispielsweise werden herstellerseitig die Konzentrationen von Ibuprofensaft unterschiedlich ausgewiesen. Entweder die Angabe erfolgt in mg/ml oder sie erfolgt in %. In der Datenbank ist für eine Einzeldosis in diesen Fällen, trotz äquivalenter Konzentration, z. B. für einen Saft mit einer Ibuprofenkonzentration von 20 mg/ml eine Einzeldosis pro Zähleinheit von 20 mg ausgewiesen; hingegen für eine Konzentrationsangabe von 2 % keine Einzeldosis ausgezeichnet. Die kleinste empfohlene Einzeldosis dieser Produktgruppe für Säuglinge im Alter von sechs bis acht Monaten und fünf bis sechs Kilogramm Körpergewicht liegt bei 2,5 ml Saft (entspricht einem halben Messlöffel) und beträgt damit 50 mg Ibuprofen (Rote Liste, 2022). Wird für die Einzeldosis als Rechengröße 20 mg (Angabe Datenbank für Produkte mit Konzentrationsangabe 20 mg/ml) verwendet, bedeutet dies für die kleinste

empfohlene Einzeldosis (50 mg laut Hersteller und Rote Liste) den Verbrauch von 2,5 ZE mit je einem Milliliter Flüssigkeit. Ist in der Datenbank keine Angabe für eine Einzeldosis je Zähleinheit hinterlegt (betrifft Produkte mit Konzentrationsangabe in %), muss eine Annahme für die Einzeldosis getroffen werden. Naheliegend ist hier die Verwendung der kleinsten Einzeldosis, die laut Hersteller bzw. Rote Liste empfohlen wird, in diesem Fall also 50 mg. Genauso wäre eine Annahme von 20 mg möglich, welche für dieselbe Produktgruppe bereits verwendet wurde (Angabe der Konzentration mit 20 mg/ml statt 2 %). Ebenfalls möglich ist die Annahme einer Durchschnittskonzentration dieses Produktes, welche sich aus dem arithmetischen Mittel der jeweils gewichtsadaptierten, kleinsten empfohlenen Einzeldosis ergibt. Dies entspricht 50 mg für Säuglinge im Alter von sechs bis acht Monaten oder 200 mg für Kinder von sieben bis neun Jahren (Rote Liste, 2022). Damit würde die rechnerische Einzeldosis 125 mg betragen.

Ein anderes Beispiel ist die Anwendung von Gelen. Zwar wird bspw. für Ibuprofen eine Einzeldosis mit einem Gelstrang von 4-10 cm angegeben, was 100-250 mg Ibuprofen entspricht (Rote Liste, 2022); im konkreten Anwendungsfall dürfte die verwendete Gelmenge jedoch erheblichen Schwankungen unterworfen sein. Dies betrifft z. B. die Gelstranglänge und -dicke bei Entnahme aus der Tube oder die Größe des behandelten Hautareals (etwa Rücken oder Handgelenk) und die Dicke des dort applizierten Gelfilmes. Die oben beschriebenen Unsicherheiten zu Einzeldosen der Wirkstoffe wurden für verschiedene Szenarien kalkuliert und betragen, im Falle von Ibuprofen, einige hundert Kilogramm bis zu wenigen Tonnen. Für die anderen Wirkstoffe fallen die Unsicherheiten kleiner aus. Durch die Wahl der typischen Einzeldosis bzw. der kleinsten empfohlenen Einzeldosis (siehe Kapitel 3.2.1), bewegen sich die in Kapitel 4.1 dargestellten Ergebnisse an der kalkulatorisch unteren Grenze. Tatsächlich liegen die Verbrauchsmengen wahrscheinlich höher.

Um zukünftig Daten höherer Qualität zu erhalten, wären gesetzlich vorgeschriebene Berichtspflichten über Abgabemengen hilfreich.

5.2 Wirkung der verwendeten Arzneimittel auf *C. elegans*

Bekannte Wirkmechanismen und Stoffwechselwege bilden eine wichtige Grundlage um Arzneimittelwirkungen verstehen, einschätzen und voraussagen zu können. Das Wissen über die Wirksamkeit und den Wirkmechanismus einer Substanz darf jedoch nicht dazu verleiten anzunehmen, dass diese Betrachtung abschließend sei. Einige langjährig eingesetzte Wirkstoffe, z. B. Paracetamol und Metamizol, wurden und werden ohne exaktes Wissen zum Wirkmechanismus eingesetzt (siehe Kapitel 1.2). Auch die Kenntnis des genauen Stoffwechselweges bei einem Organismus, bspw. dem Menschen, schließt nicht aus, dass die Wirkung ggf. anteilig auf bisher unbekanntem Stoffwechselwegen beruht.

Arzneimittelwirkungen können spezifisch oder unspezifisch sein. Oft wird eine bekannte Interaktion mit einer bestimmten Zielstruktur genutzt (siehe Kapitel 1.3). Da im Falle der Nematode *C. elegans* keine COX vorhanden ist, die beim Menschen und anderen Wirbeltieren als primärer Mechanismus der Arzneimittelwirkung, bspw. von Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol verstanden wird, kann sie in diesem Fall nicht zur Erklärung der Effekte herangezogen werden. Dennoch sind bei *C. elegans* Effekte bei der Exposition mit Diclofenac zu beobachten.

Das Fehlen oder Vorhandensein eines definierten Stoffwechselweges lässt keinen sicheren Rückschluss auf die Wirksamkeit eines bestimmten Wirkstoffes zu, da diese Wirkung über einen anderen Stoffwechselweg vermittelt werden kann, er eine andere Wirkung hat als im Referenzorganismus oder sowohl Wirkung als auch Stoffwechselweg bisher noch nicht entschlüsselt sind.

Ebenso denkbar ist, dass eine Überschneidung, sowohl der Stoffwechselwege als auch der Effekte vorhanden ist und damit eine eindeutige Zuordnung erschwert oder verdeckt wird.

Eine Risikobewertung wird so deutlich komplexer. Nur durch Screeninguntersuchungen können nicht vorhersagbare Wirkungen aufgedeckt werden. Die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen orientieren sich aus diesem Grund an den Löslichkeitsgrenzen und sind für Diclofenac in einer logarithmischen Reihe aufgebaut.

Auf *C. elegans* waren mit den verwendeten Dosierungen von Diclofenac als Einzelwirkstoff, mit der Mischexposition von Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol, sowie bei der Exposition gegenüber Ablaufwasser keine akuttoxischen Effekte innerhalb von 48 Stunden nachweisbar (siehe Kapitel 4.2).

Bei der Exposition von *C. elegans* gegenüber Diclofenac in unterschiedlichen Konzentrationen und dem Betrachten über die gesamte Lebensspanne, konnten allerdings Effekte festgestellt werden (Abb. 5, Tab. 8, Tab. 9).

Mit zunehmender Konzentration des Wirkstoffgehaltes im Medium, als auch über die Aufnahme der konditionierten *E. coli*, zeigte sich eine Verringerung der Lebensspanne. Auch wenn der Effekt, welcher über das Futter vermittelt wurde, geringer ausfiel, schien dies jedoch eine zusätzliche Belastung für den Gesamtorganismus *C. elegans* darzustellen. Die Kombination von höchster Medienkonzentration mit konditionierten *E. coli* höchster Belastungskonzentration (Kennung D4) führte zu einer deutlichen Reduktion der medianen Lebensspanne auf 30 % (95 % KI; 0,17-0,55) im Vergleich zur Kontrolle (Kennung A1) (Tab. 9).

In ihrem natürlichen Habitat stehen alle Organismen gleichermaßen einer Umweltbelastung mit toxischen Stoffen gegenüber. Vorstellbar ist etwa eine Aufnahme des Wirkstoffes in *E. coli* durch Diffusion oder aktive Zellprozesse mit anschließender Metabolisierung und ggf. darüber hinaus eine Anreicherung im Bakterium (Einfluss auf Bakterienwachstum siehe auch

Kapitel 5.3). Insofern bildet ein bereits selbst vorbelastetes Futter eine zusätzliche Ebene in der Nahrungskette ab.

Bei der Exposition mit Kläranlagenablaufwasser kann eine Mischexposition unbekannter Zusammensetzung angenommen werden. Hier schien sich jedoch kein deutlicher Effekt zu zeigen. Die mediane Lebensspanne sank in beiden Gruppen (Kennung E2, E3) auf 91 % (Abb. 6, Tab. 8); das entsprechende Konfidenzintervall liegt bei 0,49-1,68 bzw. 0,46-1,81.

Ebenso zeigte die Mischexposition mit den vier Wirkstoffen Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol in den festgelegten Stoffmengenkonzentrationen einen gering ausgeprägten Einfluss auf die Verkürzung der Lebensspanne mit einer Reduktion auf 70 % (95 % KI; 0,35-1,39), 84 % (95 % KI; 0,44-1,66) bzw. 80 % (95 % KI; 0,43-1,50) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 7, Tab. 10). Eine mögliche Ursache könnte in der ca. 25- bis 100-fach niedrigeren Konzentration der Mischexposition im Vergleich zur Konzentration von Diclofenac liegen (Spanne von 500-2.000 $\mu\text{mol/l}$ zu 20 $\mu\text{mol/l}$).

Zusätzlich könnte eine qualitative und quantitative Analyse der im Ablaufwasser vertretenen Wirkstoffe Daten liefern, die eine bessere Einordnung im Vergleich zur standardisierten Versuchskonzentration ermöglichen. Die Mischexposition kann in dieser Konstellation als standardisierte Umgebung für eine Mehrfachbelastung betrachtet werden, welche reproduzierbar in einem fixierten Mischungsverhältnis für diese vier Analgetika steht.

Die Bewegung von *C. elegans* nach einer Berührung beruht auf der Vermittlung des Reizes, welcher von den Mechanorezeptoren aufgenommen wurde und über Interneurone an die Motoneuronen weitergeleitet wird (Goodman und Sengupta, 2019; Goodman, 2006). Letztlich setzen die kontraktilen Strukturen den Reiz in eine Bewegung um. Innerhalb der gesamten Kaskade ist eine Beeinflussung denkbar. Die Erfassung der Lokomotionsdaten kann aus diesem Grund wertvolle Hinweise auf eine Schädigung bzw. Beeinträchtigung des Nervensystems und der Muskelzellen geben. So kann etwa angenommen werden, dass neurotoxische Substanzen lähmend bzw. sedierend auf die Nematoden wirken oder diese etwa andere Bewegungsmuster zeigen.

Obwohl eine graduelle Zunahme der Zuordnung zu einer Kategorie geringerer Beweglichkeit über die gesamte Lebenszeit von *C. elegans* zu erwarten ist, scheint dies in der vorliegenden Experimentreihe nicht gegeben.

Es wurde der Effekt beobachtet, dass einzelne Individuen zu einem späteren Zeitpunkt offensichtlich vitaler erschienen und eine deutlich erhöhte Beweglichkeit zeigten, obwohl keine individuelle Zuordnung zu einzelnen Nematoden wegen einer fehlenden räumlichen Separierung möglich war. Diese Rückschlüsse auf einzelne Individuen sind nur möglich, wenn mehr, oder alle Nematoden wieder in einer höheren Kategorie einzuordnen sind, ohne dass ein Individuum aus der Gruppe starb oder zensiert wurde. In Abb. 10 ist in der Tag-genauen Aufschlüsselung dieser Verlauf besonders gut erkennbar. Beispielsweise waren an

Tag 6 in der Gruppe mit Diclofenac 0 mmol/l im Medium und unkonditionierten *E. coli* (Abb. 10, A) Nematoden in Kategorie B, jedoch an den darauffolgenden fünf Tagen alle Nematoden wieder in Kategorie A eingeordnet, ohne dass ein Individuum starb. Auch in der Gruppe mit Diclofenac 0,5 mmol/l im Medium und konditionierten *E. coli* 0,5 mmol/l (Abb. 8 B) ist zu sehen, dass an Tag 4 Nematoden den Kategorien A und B zugeordnet waren, an Tag 7 jedoch alle Nematoden in Kategorie A. Eine Erklärung allein durch eine veränderte Einteilung der Nematoden in Grenzfällen und eine Zuordnung auf verschiedene Kategorien scheint nicht wahrscheinlich. Die individuelle Beurteilung der Lokomotion wird nur durch einen veränderten Versuchsaufbau möglich. Dazu müssten die Individuen in abgetrennten Kompartimenten separiert werden. Dieses Vorgehen hatte in Vorversuchen zur akuten Toxizität jedoch zu einer erheblichen Verkürzung der Lebenserwartung geführt, weshalb bei den Experimenten zur Lokomotion darauf verzichtet wurde.

Während das Ausscheiden von weniger beweglichen Nematoden aus der Gesamtheit, und damit ein erhöhter Anteil beweglicher Nematoden als Selektionsvorteil gewertet werden könnte, ist dies bei einer unveränderten Gesamtzahl der Individuen nicht möglich. Eventuell wurde die beobachtete Variabilität der Beweglichkeit durch Änderung der Wirkstoff- oder Metabolitenkonzentration beim Medienwechsel verursacht oder vom neu zugeführten Futter beeinflusst. Ebenso denkbar ist eine unterschiedliche Sensibilität in den verschiedenen Entwicklungsstadien, da mikroskopisch in einigen Gruppen die Entwicklungsphasen prolongiert erscheinen.

Insgesamt ist eine hohe Unschärfe im Beobachtungszeitraum des Tests ohne klare Ursachenzuordnung zu sehen.

Besonders deutliche und eindeutige Ergebnisse waren hingegen in den Untersuchungen zur Reproduktionstoxizität zu beobachten. Betrachtet über die gesamte Lebensspanne deutet zunächst eine weitgehend gleichbleibende Gesamtanzahl von Nachkommen, bzw. bei steigendem Wirkstoffgehalt mit leicht fallender Tendenz, auf keinen großen zu erwartenden Nachteil in der Reproduktion hin (Abb. 12). Bei genauerer Betrachtung zeigte sich jedoch ein möglicher Selektionsnachteil durch die veränderte Kurve der Tageshöchstwerte der Nachkommenanzahl pro Nematode und die deutlich prolongierte Phase der Eiablage (Abb. 14). Die Verteilung der Gesamtzahl der Nachkommen über einen langgestreckten Zeitraum bedeutet, dass unter Freilandbedingungen die einzelnen Nematoden vor ihrem Ableben, möglicherweise durch einen vorzeitigen Tod, nicht die Gelegenheit haben, über den gesamten Zeitraum die maximal mögliche Anzahl von Eiern zu legen und damit das volle Nachkommenschaftspotenzial auszuschöpfen. Dies bedeutet einen Selektionsnachteil und wird sowohl über Medium als auch über das Futter vermittelt. Je höher die Wirkstoffkonzentration im NGM_k als auch des Wirkstoffes bei Konditionierung der *E. coli* war, umso ausgedehnter war die reproduktive Phase, und umso kleiner fiel das Kurvenmaximum

der Tag-genau aufgeschlüsselten Nachkommenanzahl pro Nematode aus (Abb. 14 und Abb. 15).

Kläranlagenablaufwasser als Abbildung einer realitätsnahen Umgebung mit Mehrfachbelastung schien auf die Reproduktionstoxizität in der vorliegenden Wirkstoffkonzentration keine Auswirkung zu haben.

Mikroskopisch wurde, wie bereits in Kapitel 4 beschrieben, beobachtet, dass mit steigender Wirkstoffkonzentration Larven kleiner erschienen, bzw. langsamer wuchsen. Dies kann als längeres Verweilen der Nematoden in einem Larvenstadium gedeutet werden. Damit kann eventuell auch ein Teil des eingetretenen reproduktionstoxischen Effektes erklärt werden, nämlich dass das Maximum der Gesamtzahl aller Nachkommen pro Nematode, aufgetragen nach Tagen, kleiner ausfiel und eine langgestreckte Kurve ausgebildet wurde. Die Nematoden, welche einer höheren Wirkstoffkonzentration, entweder über das Medium oder über das Futter ausgesetzt wurden, durchliefen eine retardierte Entwicklung, wuchsen langsamer und erreichten verspätet das adulte Stadium, weshalb sie folglich die Eiablage verzögert begannen und beendeten. Durch die zusätzlich auftretenden toxischen Effekte, welche bei der Betrachtung der Lebensspanne sichtbar sind, überdeckte der früher eintretende Tod das prolongierte Larvenstadium. Die kleineren toten Larven im nichtauszählbaren Stadium weisen ebenfalls auf eine Toxizität in frühen Entwicklungsstadien hin.

Um dieser Vermutung nachzugehen, könnten in zukünftigen Versuchen Larven verschiedener Stadien gleichen Konzentrationen ausgesetzt werden. Jüngere Larven würden eventuell empfindlicher auf diese Stressoren, z. B. mit dem Übergang in ein Dauerlarvenstadium, reagieren und so ein eindeutigeres Ergebnis zeigen.

Aufgrund der Bedeutung der hier verwendeten Arzneimittel und deren spezieller Einsatz als Cyclooxygenasehemmer wird im Folgenden näher die Verknüpfung der Wirkmechanismen und Effekte von Cyclooxygenase (COX), Cyclooxygenasehemmern sowie Prostaglandinen und deren Synthese betrachtet.

Prostaglandine sind Gewebshormone und treten bei unterschiedlichen Vorgängen, bspw. der Schmerzvermittlung, Entzündungsprozessen oder Blutgerinnung und in unterschiedlichen Organen wie etwa Magen, Zervix, Schwellkörper, etc., in Erscheinung. Die Cyclooxygenase (COX) ist phylogenetisch hoch konserviert und katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Synthese von Prostaglandinen. In allen Organismen in denen die COX nachgewiesen wurde, darunter in Korallen, Manteltieren und Wirbeltieren, werden die zwei COX-Isoenzyme von zwei Genen kodiert (Chandrasekharan und Simmons, 2004). Auch beim Menschen spielt die COX bei physiologischen Stoffwechselfvorgängen eine Rolle und es lässt sich die Prostaglandinsynthese durch COX-Hemmer beeinflussen. So kommen

COX-Hemmer beim Menschen wegen ihrer entzündungshemmenden, schmerzlindernden und blutgerinnungshemmenden Wirkung zum Einsatz. Hierzu zählen die häufig eingesetzten Arzneimittel Ibuprofen, Acetylsalicylsäure oder Diclofenac.

In Organismen, in denen keine COX gefunden wurden, darunter Insekten, Einzeller und Pflanzen, konnten dennoch Prostaglandine nachgewiesen werden. In dem Protozoon *Entamoeba histolytica* wurde z. B. ein Enzyme entdeckt, welches ebenfalls die Synthese von Prostaglandin E₂ aus Arachidonsäure katalysiert, jedoch nicht strukturverwandt mit COX zu sein scheint (Chandrasekharan und Simmons, 2004).

C. elegans kann ebenfalls Prostaglandine der F-Serie aus ungesättigten Fettsäuren synthetisieren, obwohl COX nicht im Genom von *C. elegans* kodiert ist. Dabei nutzt *C. elegans* einen COX-unabhängigen Stoffwechselweg, dessen Syntheseenzyme noch nicht bekannt sind. Es wird vermutet, dass auch dieser Stoffwechselweg hoch konserviert ist. Dieser COX-unabhängige Syntheseweg lässt sich bspw. auch in der Maus und in humaner Follikelflüssigkeit nachweisen; trotz ihres reichlichen Vorkommens sind die dazugehörigen Funktions- und Regulationsmechanismen jedoch unbekannt. In der Nematode *C. elegans* haben die COX-unabhängigen Prostaglandine eine wichtige Funktion bei der Spermienlenkung und der Befruchtung. Außerdem scheint der Stoffwechselweg dort in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen, wie der Ernährung, einer Regulation durch Pheromone (etwa Ascaroside) zu unterliegen. Durch günstige Umweltbedingungen wird die Prostaglandinsynthese im Ovar, vermittelt durch Neurosekretion von TGF β (*transforming growth factor* β) bzw. DAF-7 (*abnormal dauer formation-7*), angeregt. Ascaroside sind Pheromone die mit der Populationsdichte korrelieren und bei hohen Konzentrationen zu einer Hemmung des DAF-7-Signalwegs führen und damit eine Überbevölkerung vermeiden (Tiwary *et al.*, 2021).

Ein weiterer Regulationsmechanismus der Prostaglandinsynthese in *C. elegans* beruht auf der herabgesetzten bzw. verstärkten Aktivität des Transkriptionsfaktors DAF-16. Eine erhöhte DAF-16 Aktivität im Nukleus verursacht eine geringere Prostaglandinsynthese und führt sowohl zu einer verminderten als auch späteren Nachkommenschaft. Aufgrund der erhöhten Aktivität von DAF-16 kommt es zu einer Vitellogeninunterdrückung und in Folge dessen zu einem verringerten Transport von ungesättigten Fettsäuren zur Oozyte, welche dort als Vorläufermoleküle zu Prostaglandinen umgebaut werden (Edmonds *et al.*, 2010; Tiwary *et al.*, 2021).

DAF-16, das Homolog von FOXO (*Forkhead-Box-Protein O*) in *C. elegans*, ist in mehreren Regulationsmechanismen involviert, die bspw. mit Langlebigkeit, Entwicklung, Stressresistenz und Energiestoffwechsel assoziiert sind. Aus der Forschung zu Alterungsprozessen sind mehrere Stoffwechselwege bekannt, die das Altern verzögern bzw. zu einer höheren Lebensspanne führen. Alterungsprozesse und Reproduktionsprozesse

scheinen über einige Mechanismen in Wechselwirkung zu stehen. Verschiedene Stoffwechselwege führen dabei zu DAF-16/FOXO, welcher einen gemeinsamen Streckenpunkt darstellt. Gut erforscht ist die hoch konservierte Signalkaskade von *Insulin/Insulin-like signaling* (ILS), welche bei Aktivierung über eine Phosphorylierung von DAF-16/FOXO zu der Regulierung des Transkriptionsfaktors führt. Durch die Phosphorylierung von DAF-16 wird dessen Translokation in den Nukleus inhibiert. Die beiden Signalwege von TGF β und Insulin sind miteinander verknüpft. Infolge einer weiteren Wechselwirkung führt z. B. auch die Freisetzung von Prostaglandinen über die Vermittlung von Schwefelwasserstoff zu einer Verlängerung der Lebensspanne bei niedrigen Temperaturen (Kenyon, 2010; Tiwary *et al.*, 2021; Narasimhan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2020). Studien an *C. elegans*, bei denen COX-Hemmer als Agens eingesetzt wurden, konnten keinen etwaigen Zusammenhang mit dem Prostaglandinstoffwechsel bzw. der Prostaglandinsynthese belegen. Edmonds *et al.* (2010) verwendeten den COX-1-Inhibitor SC-560, den COX-2-Inhibitor CAY-10404, Indomethacin sowie ASS. Ching *et al.* (2011) konnten für den selektiven COX-2-Hemmer Celecoxib und das strukturverwandte Analogon OSU-03012 ohne COX-Aktivität, nachweisen, dass diese in *C. elegans* eine lebensverlängernde Wirkung haben, Alterungsprozesse verzögern, sowie das Tumorstadium hemmen können. Diese Wirkung wird allerdings auf eine Interaktion und Vermittlung über ILS und DAF-16 zurückgeführt. Für Celecoxib konnte mit einer Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ kein Einfluss auf die Nachkommenschaft nachgewiesen werden (Edmonds *et al.*, 2010; Ching *et al.*, 2011).

Trotz aller Unterschiede sind Prostaglandine sowohl bei Säugetieren als auch bei Nematoden in Reproduktionsprozesse involviert und stellen ein verbindendes Element dar. Auch beim Menschen werden COX-Hemmer wie Diclofenac, Naproxen und Piroxicam und deren Einfluss als Ovulationshemmer mit reversibler Unfruchtbarkeit in Verbindung gebracht (Stone *et al.*, 2002). Welche konkreten Stoffwechselwege und Syntheseeenzyme mit welchen konkreten Gewichtungen, sowie ggf. bisher unbekannte Stoffwechselwege von Bedeutung sind, bedarf dabei noch weiterer Forschung.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Effekte bei Reproduktion und der Lebensspanne von *C. elegans*, welche in dieser Arbeit bei der Exposition gegenüber dem COX-Hemmer Diclofenac beobachtet wurden, auf einer Interaktion bzw. Beeinflussung des Prostaglandinstoffwechsels beruhen.

Die beobachteten Effekte zur Entwicklung, einschließlich der Lebensspanne und Reproduktionstoxizität der Nematoden beruhen möglicherweise auch auf einer Überlagerung von protektiven Effekten mit toxischen Effekten bzw. könnte im niedrigen Konzentrationsbereich ein hormetischer Effekt der COX-Hemmer zum Tragen kommen. Hormesis beschreibt eine Dosis-Wirkung-Beziehung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass

niedrigere Dosierungen einen positiven Effekt aufweisen, währenddessen höhere Dosierungen eine schädigende Wirkung zur Folge haben (Mattson, 2008). Interessanterweise wurde für Paracetamol eine lebensverlängernde Wirkung für niedrige Konzentrationen (0,01 %) und lebensverkürzende Wirkung für höhere Konzentrationen (1 %) beschrieben (Lublin *et al.*, 2011).

Es könnte sein, dass in ähnlicher Weise verschiedene Konzentrationsbereiche zu unterschiedlichen Effekten führen. Die beobachteten Effekte bei Diclofenac verstärkten sich mit zunehmender Näherung an die Löslichkeitsgrenze des Wirkstoffes (siehe Kapitel 4). In den niedrigeren Konzentrationen waren jedoch kaum oder uneindeutige Effekte bei Diclofenac und der Mischexposition zu sehen. Mit Hilfe weiterer Untersuchungen in feinstufigen Dosierungen könnten sich hier z. B. neue Erkenntnisse gewinnen lassen.

Wie bereits eingangs erwähnt, muss das Wissen über die zugrundeliegenden Wirkmechanismen von Humanarzneimitteln nicht vollständig sein und kann insbesondere nicht ungeprüft vom Menschen auf andere Spezies, etwa *C. elegans*, übertragen werden. Das oben dargestellte Beispiel Celecoxib zeigt, dass in zwei verschiedenen Organismen unterschiedliche Stoffwechselwege angesprochen werden können. Beim Menschen kommt es zu einer COX-Hemmung, bei *C. elegans* zu einer Interaktion über ILS und DAF-16. Umgekehrt kann auch die Biosynthese z. B. von Prostaglandinen über verschiedene Stoffwechselwege von zwei Wirkstoffen unterschiedlicher Wirkweise beeinflusst werden. Celecoxib kann seine Wirkung als COX-Hemmer entfalten; das Celecoxib-Analogon ohne COX-Aktivität nimmt indirekt über die Regulation des Transkriptionsfaktors DAF-16/FOXO auf die Prostaglandinsynthese Einfluss. Die Strukturähnlichkeit von Substanzen bedeutet eben gerade nicht, dass immer der gleiche Stoffwechselweg genutzt wird.

Dieses Beispiel verdeutlicht die Komplexität und das Potenzial an Unwägbarkeiten, welche für die Abschätzung der Umweltfolgewirkung zu beachten sind und aufgrund von Daten- und Wissenslücken bestehen. Weitere Forschung ist notwendig, um dieses Defizit abzubauen.

5.3 Bewertung und Verwendbarkeit als Modellorganismus

Die Konzentration der Wirkstoffe orientierte sich an der Löslichkeit in Wasser, der Toxizität und den Nachweisen in Wasser. Es wurde bewusst auf einen Zusatz von organischen Lösungsmitteln wie z. B. DMSO, die eine höhere Konzentration bzw. Löslichkeit ohne Ausfällungen im Medium ermöglichen sollen, verzichtet. So wird einerseits eine zusätzliche Noxe vermieden, andererseits sind in dem natürlichen Habitat ohnehin nur Löslichkeiten zu erwarten, die denen des Wassers entsprechen. Für wasserlösliche oder transportfähige Arzneimittel sind die Medien Wasser und Boden aus umwelttoxikologischer Sicht von

gesteigertem Interesse, da sie die Kompartimente mit den höchsten Belastungen stellen (siehe Eintragspfade Kapitel 1.4 und Kriterien für eine Umweltrelevanz Kapitel 5.1).

In den kleinen flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen und Spalten im Boden können kleine, primär aquatische Organismen wie Nematoden leben und sich zwischen den einzelnen Bodenpartikeln bewegen. Im Kapillarwasser haben sie durch ihre permeable Kutikula direkten Kontakt zu der sie umgebenden Umwelt (Bongers und Ferris, 1999). Durch diese Lebensweise im Boden und der daraus direkt folgenden Möglichkeit *C. elegans* sowohl auf Festmedium, als auch in Flüssigkultur halten zu können, ist *C. elegans* hervorragend als Modellorganismus für Umwelttoxizitätsstudien geeignet. Zusätzlich hilfreich sind viele weitere vorteilhafte Eigenschaften wie Transparenz, Größe, Vermehrungsrate und Lebensspanne (siehe auch Kapitel 1.8). Die verschiedenen Spezies der Nematoden sind an variierende Umweltbedingungen angepasst. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen, selbst unter widrigsten Bedingungen, können Rückschlüsse von den Art- bzw. Familienzusammensetzungen auf die Umweltbedingungen gezogen werden (Bongers und Ferris, 1999). Bereits in den 1970er Jahren wurden Nematoden in der Wasserqualitätsbewertung verwendet. Zullini (1976) verglich das Vorkommen und die Spezieszusammensetzung der Nematoden als Form eines Bioindikators mit chemisch-physikalischen Parametern an verschiedenen Messstellen eines verschmutzten Flusses (Zullini, 1976). In einer vom Umweltbundesamt beauftragten Studie „Ökologische Sedimentkartierung der großen Flüsse Deutschlands“ wurden neben abiotischen Untersuchungen des Sediments auch biologische Tests mit *C. elegans* und *Chironomus riparius* durchgeführt. Dabei wurden jedoch abgetötete Nematoden nach den Parametern Längenwachstum, Eibildung, Eizahl und Reproduktion bewertet. In der Elbe wurde bei Königstein, im Mittellauf und im Bereich des Hamburger Hafens einerseits eine starke oder vollständige Hemmung der Reproduktion festgestellt, andererseits wurde für einige Sedimente, z. B. in Pirna, Riesa, Aken oder Sandau, ein teilweise erheblicher positiver Effekt auf die Reproduktion erkannt. Insgesamt erwies sich der Nematodentest hier gegenüber dem Chironomidentest als sensitiver (Duft *et al.*, 2003).

Weltweit verursachen Kläranlagen einen maßgeblichen Eintrag der flüssigen Emissionen von Arzneimitteln. Dabei wurden, nach der Zusammenstellung des UBA, für Diclofenac in 49 Ländern Werte $> 0,01 \mu\text{g/l}$, und in 44 Ländern Werte von $> 0,1 \mu\text{g/l}$ nachgewiesen. Der weltweite Höchstwert stammt aus der Slowakei mit $2.051 \mu\text{g/l}$ und wurde in unbehandeltem Abwasser gemessen. Die höchste weltweit gemessene Konzentration in Oberflächenwasser (Immission) wurde im spanischen Fluss Llobregat und seiner Nebenflüsse mit $18,74 \mu\text{g/l}$ nachgewiesen, in Deutschland wurde der Höchstwert in der Erft mit $15,033 \mu\text{g/l}$ gemessen. Für Trinkwasser stammen die Höchstwerte aus Schweden ($0,14 \mu\text{g/l}$) und Polen ($0,114 \mu\text{g/l}$). Auch in den festen Rückständen aus Kläranlagen können sehr hohe Werte erreicht werden. In Kanada wurde der Höchstwert für Feststoffemissionen mit $2,376 \text{ mg/kg}$ erreicht. EU-weit

war erneut in Spanien der Höchstwert mit 0,627 mg/kg zu verzeichnen. In Deutschland beträgt die höchste nachgewiesene Konzentration in Klärschlamm 0,212 mg/kg. Der Höchstwert einer Feststoffimmission wurde im Sediment des Segre in Spanien mit 0,024 mg/kg gemessen (UBA, 2019).

Kern und Lorenz (2008) untersuchten Proben mehrerer Entnahmestellen der Saale vor, in und nach Halle auf Rückstände ausgewählter Arzneimittel. Dabei ließen sich ebenfalls die höchsten Konzentrationen im Ablauf der Kläranlage messen. Für Diclofenac wurde ein Höchstwert von 2.039 ng/l (Median 196 ng/l), für Ibuprofen von 63 ng/l (Median 52 ng/l), Naproxen 93 ng/l (Median 19 ng/l) und Paracetamol 264 ng/l (Median 77 ng/l) nachgewiesen (Kern und Lorenz, 2008).

Die maximale Löslichkeit von Diclofenac in Wasser liegt bei 1,5 g/l (siehe Tab. 2 Spezifikationen der Arzneimittelwirkstoffe), was einer Konzentration von etwa 4,7 mmol/l entspricht. Folglich korrespondieren die verwendeten Stoffmengenkonzentrationen: 2 mmol/l (636 mg/l), 1 mmol/l (318 mg/l), 0,5 mmol/l (159 mg/l).

Der Vergleich der gemessenen Höchstwerte von Diclofenac (siehe oben) weltweit, EU-weit, deutschlandweit und in der Saale zeigt ein heterogenes Bild unterschiedlicher Konzentrationen mit großer Spannbreite. Die niedrigste im Versuch verwendete Konzentration (159 mg/l) und die höchste verwendete Konzentration (636 mg/l) liegen um ca. Faktor 78-310 von den höchsten Messwerten der EU entfernt (Emission 2.051 µg/l).

Innerhalb der EU ist die Wasserrahmenrichtlinie ein wichtiges Instrument in der Wasserpolitik und macht Vorgaben zur Erhaltung und Verbesserung der Wasserqualität. Für die Ableitung von Umweltqualitätsnormen wurden Daten aus mehreren Studien zusammengetragen und bspw. durch das Umweltbundesamt ausgewertet (UBA, 2014). Bisher sind noch keine national oder europäisch verbindlichen Umweltqualitätsnormen für Arzneimittel festgelegt, diese besitzen lediglich Entwurfscharakter (UBA, 2020a). Wichtig bei der Beurteilung sind die Ermittlung oder Berechnung der niedrigsten Konzentration, bei der ein Effekt auftrat (LOEC) bzw. die höchste Stoffkonzentration, bei der kein Effekt auftritt (NOEC). Die Bewertung der Daten wird in regelmäßigen Abständen wiederholt und unter Umständen beim Vorliegen neuer Erkenntnisse angepasst. Die vorhandenen Daten werden jedoch unterschiedlich interpretiert. Leverett *et al.* (2021) kommt bspw. zu einer Umweltqualitätsnorm für Diclofenac in Wasser von 0,126 µg/l und schätzt den von der Europäischen Kommission ermittelten Wert aus dem Jahr 2021 (Entwurf) von 0,040 µg/l als zu niedrig ein. Nach Ansicht der Autoren werde durch die Verwendung von histopathologischen Effektgrenzen das Risiko überzeichnet.

Nach Angaben des UBA wurde die PNEC, welche für Diclofenac auf 0,05 µg/l festgelegt ist, an 21 der 24 Messstellen, die im Rahmen des Messprogramms Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) beprobt wurden, überschritten (Loos *et al.*, 2018;

UBA, 2020a). Die in Kapitel 5.1 vorgestellte Rechengröße zur Abschätzung einer Umweltrelevanz, nämlich der Quotient aus PEC : PNEC, ist bei diesen Messwerten > 1. Es kann in diesem Fall die PEC durch die gemessene Umweltkonzentration (MEC) ersetzt werden. Die ermittelten Werte geben Anlass zu näheren toxikologischen Betrachtungen.

Zur Einordnung der verschiedenen Konzentrationen sind bereits ermittelte toxikologische Daten interessant. Die akute Toxizität LD₅₀ für Diclofenac bei der Maus beträgt 140-390 mg/kg Körpergewicht (Caelo, 2018a). Für verschiedene Geierarten wurden LD₅₀-Werte von 0,225-0,8 mg/kg ermittelt (Swan *et al.*, 2006). Bei aquatischen Organismen ist eine erhebliche Spanne unter den Spezies von (sub-)akut bis (sub-)chronisch zu verzeichnen. So ergaben etwa toxikologische Versuche an Modellorganismen wie Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Zebrafisch (*Danio rerio*), Wasserfloh (*Ceriodaphnia dubia* und *Daphnia magna*), Wasserlinse (*Lemna minor*), Grünalge (*Desmodesmus subspicatus* und *Pseudokirchneriella subcapitata*) oder Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri*) für Diclofenac eine Effektspanne von 0,005 mg/l bis 68 mg/l. Im Vergleich dazu bewegen sich diese Konzentrationen für Ibuprofen in einem Bereich von 4 mg/l bis 315 mg/l (SRU, 2007).

Triebskorn *et al.* (2007) konnten mit histopathologischen Untersuchungen an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) zeigen, dass nach einer Langzeitexposition von 28 Tagen Schäden an Leber, Nieren und Kiemen bereits ab einer Konzentration von 1 µg/l Diclofenac nachweisbar sind. Mit 1 µg/l liegt die LOEC unter der nachgewiesenen Oberflächenwasserkonzentration und damit im Bereich umweltrelevanter Konzentrationen (siehe oben). Dabei wird von den Autoren eine Verbindung mit den Nierenbefunden an Bachforellen und den Nierenschäden an Geiern hergestellt und vermutet, die Ursache könnte eine gestörte Prostaglandinsynthese sein, welche zu einem Ungleichgewicht der renalen Homöostase führt. Die Autoren weisen darauf hin, dass durch eine Fokussierung auf akuttoxische Effekte umweltrelevante Konzentrationen leicht unterschätzt werden. Aus diesem Grund sollten chronische Toxizitätstests, Methoden welche den Wirkmechanismus berücksichtigen Anwendung finden, sowie Mischexpositionen mehr in den Fokus weiterer Untersuchungen gerückt werden (Triebskorn *et al.*, 2007).

Clevers (2008) konnte an *Daphnia magna* nachweisen, dass Arzneimittelwirkstoffe in einer Mischexposition eine deutlich höhere Toxizität aufweisen, als es entsprechend dem rechnerischen Anteil der Einzelstoffe zu erwarten wäre. Die drei Wirkstoffe Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen, welche beim Menschen als COX-Hemmer eingesetzt werden, besitzen mutmaßlich den gleichen Wirkmechanismus. Als wesentliche Effekte konnten beobachtet werden, dass mit steigender Konzentration weniger oder gar keine Nachkommen mehr hervorgebracht wurden und die Körpergröße der Daphnien abnahm. Tote Daphnien wurden nur vereinzelt bei den niedrigeren Konzentrationen beobachtet. Die Konzentrationen für Diclofenac betrug zwischen 5,05-22,64 mg/l, für Ibuprofen-Natrium zwischen

2,41-22,97 mg/l und für Naproxen-Natrium 2,35-64,18 mg/l (Cleuvers, 2008). Bisher ist wenig zur Cyclooxygenase in Daphnien bekannt. Aufgrund genetischer Analysen wird jedoch davon ausgegangen, dass auch *Daphnia magna* über ein Cyclooxygenasehomolog verfügt (Heckmann *et al.*, 2008).

Interessanterweise sind auch in der vorliegenden Studie mit Diclofenac an *C. elegans* reproduktionstoxische Effekte und eine Verringerung der Körpergröße mit zunehmender Wirkstoffkonzentration beobachtet worden. Zusätzlich trat eine Verkürzung der Lebensspanne ein. Gleichzeitig sind innerhalb von 48 Stunden keine akuttoxischen Effekte nachweisbar (siehe Kapitel 4). Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass im verwendeten Konzentrationsbereich von Diclofenac-Natrium (0,5-2 mmol/l bzw. 159-636 mg/l) *C. elegans* weniger empfindlich reagiert als die oben genannten Organismen. Die vorliegenden Ergebnisse stützen die These, dass mit dem alleinigen Vorliegen akuttoxischer Tests leicht Effekte unterschätzt werden können und erst bei einer chronischen Exposition toxikologisch relevante Effekte sichtbar sind. In besonderem Maße ist dies bei einer Anreicherung des Wirkstoffes im Organismus bedeutsam. So wurde bei Diclofenac für die Leber von Regenbogenforellen Biokonzentrationsfaktoren bis 2.732 ermittelt (Schwaiger *et al.*, 2004).

Für die uneindeutigen Effekte mit der Mischexposition von Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol (jeweils 40 µmol/l) könnte die deutlich niedrigere Konzentration eine Rolle spielen (siehe auch Kapitel 5.2). Da aquatische Systeme immer Mischexpositionen für die Organismen darstellen, sind summative Betrachtungen von besonderem Interesse. Ähnlich wie in der beschriebenen Studie von Cleuvers (2008), wurden in der Mischexposition Arzneimittel mit gleichgerichtetem Wirkmechanismus gewählt. Die Konzentrationen der äquimolaren Mischexposition mit Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol liegt mit 40 µmol/l für die Stammlösung an der experimentell ermittelten Löslichkeitsgrenze in Wasser. Unter Verwendung der Natriumsalze der Wirkstoffe oder mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln könnte bei weiteren Experimenten eine höhere Löslichkeit erzielt werden. Ob die COX-Hemmer tatsächlich summative oder überadditive Effekte in *C. elegans* entfalten, könnten weiterführende Studien mit Mischexpositionsexperimenten in feiner abgestuften Dosierungen und größerem Konzentrationsband zeigen.

Trotz der Verwendung von COX-Hemmern und einer Beteiligung von Prostaglandinen über verschiedene Stoffwechselwege, auch an Reproduktionsprozessen, zeigt das in Kapitel 5.2 beschriebene Beispiel von Celecoxib und einem Celecoxib-Analogen, dass ein Übertrag der gleichen Wirkmechanismen schwierig sein kann.

Häufig werden die zu testenden Stoffe in den durchgeführten Akutttests direkt in das Medium eingebracht. Um jedoch eine Exposition aquatischer Organismen auf indirektem Weg zu

realisieren, wurde bspw. von Nentwig (2006) unter Laborbedingungen mit Arzneimitteln konditioniertes Sediment verwendet und mit unbelastetem Wasser überschichtet. Erst nach einer zweiwöchigen Sedimentalterungsphase wurden die Versuchsorganismen zugesetzt (Nentwig, 2006).

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zur Konditionierung und Einsatz von *E. coli* (siehe Kapitel 3.2.5 und 3.2.12), wurde ebenfalls eine indirekte Exposition, allerdings über das Futter, erreicht. Dies hat den Vorteil, dass mit dem Einsatz von konditionierten *E. coli* eine weitere Trophiestufe einbezogen wird und sich damit zusätzliche toxikologische Erkenntnisse gewinnen lassen und eine bessere Näherung im Sinne einer simultanen Exposition aller im gleichen Medium lebenden Organismen erfolgt. Dabei hat sich herausgestellt, dass die über die Futterkonditionierung vermittelten Effekte denjenigen ähneln, die über einen Wirkstoffgehalt im Medium verursacht werden, obgleich sie in ihrer Ausprägung deutlich geringer ausfallen.

Ob COX-Hemmer eine toxikologische Bedeutung für Bakterien haben, wurde unterschiedlich beantwortet. Ching *et al.* (2011) wollten ausschließen, dass durch Celecoxib abgetötete Bakterien einen positiven Einfluss auf die Lebensspanne von *C. elegans* hatten, da Garigan *et al.* (2002) proliferierende Bakterien bzw. bakterielle Infektionen als Grund für einen Tod von *C. elegans* beschrieben hatten. Celecoxib führte allerdings mit einer Konzentration von 2 µmol/l zu keiner Inhibition des Bakterienwachstums (Garigan *et al.*, 2002; Ching *et al.*, 2011).

Von Diclofenac ist jedoch bekannt, dass es antimikrobielle Eigenschaften gegen gramnegative und grampositive Bakterien besitzt und die meisten Stämme im Wachstum mit einer Konzentration von 50-100 mg/l gehemmt werden können. An jeweils einem Stamm *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* wurde die Hemmung der bakteriellen DNA-Synthese nachgewiesen (Dastidar *et al.*, 2000). Inwieweit dabei eine Aufnahme, Speicherung oder Metabolisierung des Wirkstoffes erfolgt, muss in einer getrennten Studie untersucht werden. Es könnten bspw. während der Bakterienkultivierung engmaschig Proben entnommen werden, bei denen sowohl Wirkstoffgehalt im Medium als auch im Bakterium nach Aufkonzentrierung quantitativ gemessen wird. Anschließend sind konkrete Zuordnungen zu verändertem Wirkstoffgehalt durch Diffusion, Aufnahme und Metabolisierung in Nährmedium und Bakterien möglich.

C. elegans ist ein etablierter Modellorganismus, der sich auch bei den durchgeführten Experimenten im Rahmen dieser Arbeit als vielversprechend herausgestellt hat. Insbesondere die Kultivierung von *C. elegans* war in den verwendeten Ablaufwasserproben erfolgreich. *C. elegans* könnte in zukünftigen Untersuchungen als Indikator eingesetzt werden und als Modellorganismus bei Untersuchungen des einzuleitenden Ablaufwassers

dienen. Wie bereits in Kapitel 1.8 und 5.2 dargestellt, ist *C. elegans* in seinem natürlichen Habitat potenziell einer Vielzahl von Noxen ausgesetzt. Es ist anzunehmen, dass dagegen Überlebensmechanismen entwickelt wurden. Im direkten Kontakt schützt die Kutikula *C. elegans* vor Umwelteinflüssen (Page und Johnstone, 2007) und könnte zu einer Toleranz, besonders bei niedrigeren Konzentrationen beitragen. Um tatsächlich Wirkstoffgehalte oder Metaboliten im Soma von *C. elegans* nachzuweisen, müssten weitergehende Untersuchungen bspw. durch eine Entnahme nach unterschiedlichen Inkubationszeiten im wirkstoffhaltigen Medium folgen. Erst durch spezielle Extraktionsverfahren, die eine mechanische Zerstörung der Kutikula bspw. mit Kügelchen oder Wechseldruckverfahren vornehmen (Smejkal *et al.*, 2006), wird eine genaue chemische Wirkstoffanalyse des Somas möglich.

Möglicherweise kann in zukünftigen Forschungen auch die Versuchsanordnung nicht nur auf Experimente mit verschiedenen Arzneimitteln in Einzel- und Mischexpositionen an *C. elegans* ausgeweitet werden, sondern auch eine zusätzliche Ebene im Sinne einer Analyse der Spezieszusammensetzung verschiedener Nematoden als Bioindikator, bspw. in Klärschlamm oder in Böden, auf die Klärschlamm ausgebracht wurde, ähnlich dem bereits von Bongers und Ferris (1999) beschriebenen Prinzip, in Erwägung gezogen und etabliert werden.

5.4 Mögliche Ansatzpunkte zur Problemlösung für einen besseren Umweltschutz

Arzneimittel stellen einen unverzichtbaren Bestandteil der medizinischen Versorgung der Bevölkerung dar. Mehrere Arzneimittel, die in hohen Mengen abgegeben werden, sind weltweit als unverzichtbare Arzneimittel von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) deklariert. Darunter sind auch Arzneimittel wie Ibuprofen, Paracetamol und ASS (WHO, 2021). Diese sind allein aufgrund ihrer Eigenschaften als Hochvolumenstoffe (Verbrauch von mehreren Tonnen pro Jahr) unter umwelttoxikologischen Gesichtspunkten relevant. Diese Arzneimittel werden auch in Zukunft zum Einsatz kommen und in die Umwelt gelangen. Bei den Anstrengungen im Monitoring durch Behörden der Länder und des Bundes werden regelmäßig Überschreitungen der Grenzwerte festgestellt. In aktuellen Forschungsvorhaben ist man deshalb bemüht, den wiederkehrenden Forderungen zum Schließen der Datenlücken nachzukommen und bspw. Umweltqualitätsnormen für prioritäre Stoffe zu ermitteln (Wünnemann *et al.*, 2020). Durch verbesserte Analyseverfahren können zunehmend geringere Konzentrationen gemessen werden. So ist es möglich, dass Diclofenac im Bereich von ca. 6 ng/l nachgewiesen werden kann. Außerdem sind im Screeningverfahren mit Hilfe aktueller *in-vitro-assays* Mischexpositionen von COX-Hemmern leichter erkennbar (Frey und Scheurer, 2020).

Um dennoch mögliche Umweltfolgewirkungen zu reduzieren und zu beschränken, sind verschiedenartige Ansätze notwendig. Ziel sollte eine Reduktion des Arzneimitteleintrages in die Umwelt sein. Dies kann an mehreren Punkten im Stoffzyklus des Arzneimittels, von der Produktion bis zur Elimination bzw. der Entsorgung, geschehen. Ausgangspunkt stellt hier ein reduzierter Einsatz bzw. wo möglich, ein Austausch gegen weniger umwelttoxische Wirkstoffe dar. Das UBA hat dazu Handlungsempfehlungen zur Weiterbildung von Ärzten herausgegeben bzw. erarbeiten lassen, um in diesem Bereich eine Sensibilisierung bereits bei der Verordnung zu erreichen (Götz und Walz, 2017). Nicht verschreibungspflichtige Medikamente (OTC-Präparate) werden davon nicht erfasst, da diese weiterhin von Patienten rezeptfrei in der Apotheke oder über das Internet erworben werden können.

Die Entsorgung und der Umgang mit arzneimittelbelasteten Abwässern bietet ein großes Potenzial zur Reduktion der Belastung von Oberflächenwasser, respektive Grundwasser. Insbesondere die separate Aufbereitung potenziell hochbelasteter und problematischer Abwässer, bspw. von Krankenhäusern, Rehabilitationskliniken oder Fachpraxen, ist hier zu erwägen. In Zahnarztpraxen wird z. B. seit vielen Jahren erfolgreich mit Hilfe von Amalgamabscheidern der Quecksilbereintrag ins Abwasser bereits in der Praxis minimiert. So wird effektiv eine Reduktion an der Emissionsquelle erreicht und ein aufwendiger und kostenintensiver Aufbereitungsprozess umgangen.

Nachdem Arzneimittel über das Abwasser in die öffentlichen Aufbereitungsanlagen gelangen, werden diese oft unvollständig entfernt. Huschek und Krengel (2003) ermittelten Rückhalteraten von unter 10 %, sehen aber durch ein bestimmtes nachgeschaltetes Adsorptionsverfahren ein Eliminierungspotenzial von über 90 %. Es gibt eine Reihe von Verfahren, die mit einer 4. Reinigungsstufe in Kläranlagen, bspw. durch Ozonierung oder UV-Strahlung, eine deutlich verbesserte Elimination bzw. Degradation versprechen, allerdings noch nicht flächendeckend im Einsatz sind (UBA und BfArM, 2017, S. 32; Klauer *et al.*, 2020, S. 11).

Durch die erhöhten Anforderungen zur Reinheit des Trinkwassers, ist die chemische Oxidation mit Ozon in der Trinkwasseraufbereitung bereits ein wichtiges Standardverfahren. Unter Umständen können damit jedoch auch nicht alle Stoffe vollständig mineralisiert werden. Kümmerer *et al.* (2011) untersuchten inwieweit aus persistierenden Arzneimittelwirkstoffen und deren Metaboliten mutagene oder genotoxische Transformationsprodukte in der Trinkwasseraufbereitung durch Ozonung entstehen können.

Auch wenn durch dieses Verfahren nicht alle Stoffe sicher entfernt werden können, ist dennoch eine erhebliche Reduktion der wirksamen Substanzen zu erwarten. Durch den Verdünnungseffekt im Oberflächenwasser nach Einleitung der Abwässer werden die Konzentrationen der eventuell auftretende Transformationsprodukte, genau wie ihre Muttersubstanz, reduziert und unterschreiten so möglicherweise die festgelegten

Schwellenwert der PEC bzw. MEC von 0,01 µg/l in der Expositionsabschätzung. In dieser Hinsicht sollten zur Abwasserreinigung verstärkt Anstrengungen unternommen werden, damit bspw. eine vierte Reinigungsstufe regelhaft etabliert wird.

Für einige Arzneimittel liegen die gemessenen Umweltkonzentrationen (MEC) über der erwarteten Umweltkonzentration (PEC). Huschek und Kregel (2003) haben bspw. für Diclofenac für die Jahre 1999-2001 eine PEC von 2,1-2,2 µg/l ermittelt. Die Messwerte liegen vielfach höher, wie in Kapitel 5.3 für Messwerte von Diclofenac ausführlich dargestellt. Falls Messwerte vorliegen, kann die PEC ersetzt werden und der Quotient aus MEC : PNEC als genauere Bewertungsgrundlage dienen. Bergmann *et al.* (2011) haben in der Studie „Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln“ nur 70 Wirkstoffe identifizieren können, zu denen ausreichende Daten für eine Berechnung der MEC : PNEC vorlagen. Neben diesem Verhältnis bzw. des ökotoxikologischen Wirkpotenzials zogen die Autoren für eine Stoffpriorisierung zwei zusätzliche Kriterien hinzu: Das Vorkommen in der aquatischen Umwelt (Oberflächen-, Grund-, und Trinkwasser), sowie die Entwicklung der Verbrauchsmengen. So wurden insgesamt 97 prioritäre Wirkstoffe ermittelt. Für die Berechnung der PNEC wurden die Sicherheitsfaktoren auf bis zu 25.000 (nur eine Kurzzeitstudie) erhöht und bewusst eine Überzeichnung des kalkulierten Risikos in Kauf genommen. Andererseits weisen die Autoren darauf hin, dass angenommene Verdünnungsfaktoren, bspw. ein Faktor von 10 für die Verdünnung von Kläranlagenabläufen, bei Niedrigwasser nicht immer erreicht werden. Die Autoren unterstützen die Forderungen zu einem Altarzneimittelprogramm, verstärktem Monitoring und einer verpflichtenden Veröffentlichung von Arzneimittelproduktionsdaten und -verbrauchsdaten, welche bereits von Institutionen wie dem SRU aufgestellt wurden (Bergmann *et al.*, 2011).

In einem gemeinsamen Bericht des UBA und BfArM, sowie im Bericht für den Deutschen Bundestag ist die Problematik erkannt, bereits konkrete Vorschläge für eine Minimierung des Wirkstoffeintrages gemacht und zusätzlich weiterer Forschungsbedarf formuliert worden (UBA und BfArM, 2017; Klauer *et al.*, 2020). Darin wird unter anderem Bezug auf den Bericht des *Bio Intelligence Service* zum Umweltrisiko von Medizinprodukten genommen, der für die europäische Exekutivagentur für Gesundheit und Verbraucher erstellt wurde. Die darin enthaltenen Ergebnisse beziehen sich auf die gesamte Europäische Union und entfalten damit Gültigkeit für die Bundesrepublik Deutschland. Die Autoren fordern ebenfalls eine Aufarbeitung anhand einer Prioritätenliste, Konzentration auf Wirkstoffbewertungen und das Abwenden von Produktbewertungen. Außerdem sollte auf systematische Erfassungs- und Berichtspflichten für die entsprechenden Stoffe, insbesondere Internetverkäufe und OTC-Präparate hingewirkt werden, sowie eine angepasste Verschreibung von Arzneimitteln, Organisation und Etablierung eines Arzneimittelrücknahmesystems inklusive einer verbesserten Elimination in Klärwerken erreicht werden. Zusätzliche Forschungen zur

chronischen Toxizität, auch im Niedrigkonzentrationsbereich und bei Mischexposition, sowie das Einbeziehen, bzw. die Ausdehnung auf Tierarzneimittel sind notwendig (Bio Intelligence Service, 2013).

Wenn Arzneimittel über den Hausmüll entsorgt werden, können sie, je nach lokalem Entsorgungskonzept, in eine mechanisch-biologische Aufbereitungsanlage oder chemisch-physikalische Aufbereitungsanlage gelangen und werden dort nicht vollständig entfernt. Im Falle einer thermischen Verwertung des Hausmülls werden die biologisch aktiven Substanzen zerstört (SRU, 2007, Tz. 29). Um Einträge über diese Wege zu minimieren wäre ein einheitliches Entsorgungskonzept anzustreben. Dazu werden immer wieder Aufklärungskampagnen, bspw. vom Umweltbundesamt, zur fachgerechten Entsorgung initiiert (UBA, 2015).

Die vorgelegte Konzentration der Wirkstoffe spielt für toxikologische Betrachtungen in Bezug auf Oberflächenwasser, Grundwasser, Abwasser oder andere belastete Medien eine entscheidende Rolle. In der Regel werden gemittelte Belastungsszenarien angenommen. Die einzelnen Wirkstoffe treten jedoch örtlich und zeitlich in unterschiedlichen Zusammensetzungen im Abwasser bzw. den Umweltmedien auf. Von der bekannten Stoffmengen-zusammensetzung aus einer Abgabestatistik kann es im Einzelfall erhebliche Abweichungen geben, da die tatsächlich ausgeschiedene Menge bzw. anderweitig in die Umwelt und das Abwasser eingebrachte Menge, deutlich unter oder über den Mittelwerten liegen kann. Wie bereits von Huschek und Krenzel (2003) beschrieben, werden stoffspezifische Parameter wie etwa Verbrauch, Metabolisierungs- und Eliminationsproblematik oder wirksame Metaboliten berücksichtigt. Tatsächlich sind dies jedoch alles Näherungen für große geographische Gebiete wie EU, Nationalstaaten oder Bundesländer. Die konkreten Belastungssituationen an verschiedenen Messstellen, bspw. an Flüssen wie der Saale, werden im Rahmen der oben erwähnten Studie von Kern und Lorenz (2008) deutlich. Über die Messprogramme der Länder (BLAC), z. B. dem Sondermessprogramm des Landes Sachsen-Anhalt zu Arzneistoffen im Rahmen des Gewässerüberwachungsprogrammes Sachsen-Anhalt, können über bestimmte Zeiträume teilweise Daten strukturiert erfasst werden (Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt, 2006).

Außerdem sind für unterschiedliche Stoffe erhebliche Spannen der Eliminationsraten in der Abwasseraufbereitung bekannt. So konnte Ibuprofen je nach Verfahren und Anlage Eliminationsraten zwischen 57-99 % erreichen, während Diclofenac nur zu etwa 2-6 % eliminiert wurde (SRU, 2007). Um die zu erwartenden Ungenauigkeiten zu reduzieren, müssten die Wirkstoffzusammensetzungen im Abwasser vor der tatsächlichen Einleitung in die Abwasserbehandlungsanlage und anschließend das Ablaufwasser regelmäßig beprobt werden. Insbesondere ermöglicht erst eine engmaschige und koordinierte Probennahme

Messergebnisse zu vermeiden, die Schwierigkeiten bei der Interpretation bereiten, z. B. dass durch nicht korrespondierende Probennahme im Kläranlagenzulauf kleinere Arzneimittelkonzentrationen gemessen werden als im Kläranlagenablauf (Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt, 2006). Mit den so gewonnenen Daten können die Konzentrationen zu den Abgabemengen ins Verhältnis gesetzt werden. Damit wird eine Verknüpfung der Daten von Verbrauchsmengen, wie sie in dieser Arbeit ermittelt wurden, mit den gemessenen Daten vor und nach dem Kläranlagendurchlauf erst möglich.

Zusätzlich kann ein strukturiertes Monitoring von Grund- und Oberflächengewässern sowie von Kläranlagenzuläufen und -abläufen Datenlücken schließen. Der Bund/Länder-Ausschuss für Chemikaliensicherheit, dessen Fokus jedoch nicht auf Arzneimitteln liegt, verfolgt bereits ähnliche Ansätze. So könnte ein genaueres Bild der aktuellen Belastungslage gezeichnet werden. Dies ermöglicht ggf. gezieltes Eingreifen, um punktuelle oder auch strukturell bedingte Belastungen zu erkennen und effektiv verringern zu können.

Nicht zuletzt führt die Aufnahme über bestimmte Priorisierungs- oder Beobachtungslisten, wie z. B. die bereits in Kapitel 5.1 erwähnte EU-Beobachtungsliste, zu einer vermehrten Aufmerksamkeit und zukünftig zum Schließen von Datenlücken. Das betrifft sowohl das Monitoring als auch weitergehende analytische Verfahren oder Forschungen zu Wirkmechanismus und Umweltfolgewirkungen.

6 Zusammenfassung

Arzneimittel (AM) sind ein wichtiger Baustein in der Medizin und gelangen nach ihrem Einsatz, in der Regel über das Abwasser, in die Umwelt. Neu zuzulassende AM müssen eine Umweltrisikoprüfung durchlaufen. Für Alt-AM, welche vor Inkrafttreten dieser gesetzlichen Anforderung auf dem Markt waren, bestehen, trotz hoher Verbrauchsmengen, oft erhebliche Datenlücken. Dies betrifft sowohl eine strukturierte pharmakologische Aufarbeitung als auch eine Gesamtstoffbilanz. AM werden immer wieder in Umweltmedien z. B. in Oberflächenwasser nachgewiesen. Für einige Wirkstoffe sind Auswirkungen auf Nichtzielorganismen bekannt. Analgetika, von denen viele als Cyclooxygenasehemmer wirken, stellen eine große Gruppe unter den Stoffen mit möglicher Umweltrelevanz und einem Jahresverbrauch von > 80 t dar. Für eine genauere Gesamtstoffbilanz der Analgetika Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, ASS, Paracetamol und Metamizol wurde 2021 bei IQVIA eine Sonderstudie in Auftrag gegeben und ausgewertet. Im Jahr 2020 nimmt unter den abgefragten Wirkstoffen mit einem Gesamtverbrauch von ca. 1.212 t Ibuprofen die Spitzenposition ein, gefolgt von Metamizol mit ca. 969 t, Paracetamol mit ca. 476 t, ASS mit ca. 459 t, Diclofenac mit ca. 74 t und Naproxen mit ca. 34 t.

Am Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurden vier verschiedene toxikologische Tests mit Diclofenac, einer Mischexposition der Wirkstoffe Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol sowie Kläranlagenablaufwasser durchgeführt. Als Futter dienten unkonditionierte und konditionierte *Escherichia coli*, die während ihrer Kultivierung verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen ausgesetzt waren. Sie wurden in der Versuchsanordnung mit den unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen im Medium von *C. elegans* kombiniert.

Innerhalb von 48 h konnten keine akuttoxischen Wirkungen auf *C. elegans* festgestellt werden. Eine Exposition mit Diclofenac (2 mmol/l) über die gesamte Lebensspanne reduzierte die mediane Lebensspanne auf 43 % (95 % KI; 0,23-0,81). Wurden zusätzlich konditionierte Bakterien (Diclofenac 2 mmol/l) eingesetzt, sank die mediane Lebensspanne weiter auf 30 % (95 % KI; 0,17-0,55). In beiden Gruppen mit Kläranlagenablaufwasser kam es zu einer Reduktion der medianen Lebensspanne auf 91 % (95 % KI; 0,49-1,68 bzw. 0,46-1,81). Bei der Mischexposition (20 µmol/l je Wirkstoff) wurde eine Reduktion der medianen Lebensspanne auf 70-84 % (95 % KI; 0,35-1,39, 0,44-1,61 bzw. 0,43-1,50) festgestellt. Mit steigender Diclofenac-Konzentration verlängerte sich die Reproduktionsphase von *C. elegans* um mehrere Tage und die höchste Eiablage trat um ein bis zwei Tage später auf. Die toxikologischen Tests zeigten, dass *C. elegans* als Modellorganismus für Experimente mit Kläranlagenablaufwasser geeignet ist und dass der Einsatz von konditionierten *E. coli* Auswirkungen innerhalb einer Nahrungskette abbilden kann und damit den toxikologischen Kenntnisstand erhöht.

7 Literaturverzeichnis

- AMIce – Arzneimittel-Informationssystem des Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2022) Contractubex, Tenuate. Abrufdatum 25.10.2022.
- Amrhein V, Greenland S, McShane B (2019) Scientists rise up against statistical significance. *Nature* 567:305–307.
- Bauer E (2016) Menge hergestellter, importierter und abgegebener Arzneimittel. E-Mail. 24.03.2016.
- Bejuhr G (2016) Menge hergestellter, importierter und abgegebener Arzneimittel. E-Mail. 07.03.2016.
- Bergmann A, Fohrmann R, Hembrock-Heger A (2008) Bewertung der Umweltrelevanz von Arzneistoffen. *Umweltwiss Schadst Forsch* 20:197–208.
- Bergmann A, Fohrmann R, Weber F-A (2011) Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. UBA – Umweltbundesamt. Texte 66/2011.
- BfArM – Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2020) Fiktive Zulassung. Glossar. Abrufdatum 02.06.2020.
<https://www.bfarm.de/SharedDocs/Glossareintraege/DE/F/FiktiveZulassung.html>.
- Bio Intelligence Service (2013) Study on the environmental risks of medicinal products. Final report prepared for Executive Agency for Health and Consumers.
- Bongers T, Ferris H (1999) Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 14:224–228.
- Caelo – Caesar & Loretz (2018a) Sicherheitsdatenblatt Diclofenac-Natrium.
- Caelo (2018b) Sicherheitsdatenblatt Ibuprofen.
- CGC – Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota (2008) Strain Information C. elegans VC2010. Abrufdatum 02.04.2020.
<https://cgc.umn.edu/strain/VC2010>.
- CGC (2020) Strain Information E. coli OP50. Abrufdatum 08.04.2020.
<https://cgc.umn.edu/strain/OP50>.
- Chandrasekharan NV, Simmons DL (2004) The cyclooxygenases. *Genome Biol* 5.
- Ching T-T, Chiang W-C, Chen C-S, Hsu A-L (2011) Celecoxib extends *C. elegans* lifespan via inhibition of insulin-like signaling but not cyclooxygenase-2 activity. *Aging Cell* 10:506–519.
- Cleuvers M (2008) Chronic mixture toxicity of pharmaceuticals to *Daphnia* – The example of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Kümmerer K (Hrsg): *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer, Berlin-Heidelberg, 277–284.
- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M (2015) A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 200:387–407.

- Dastidar SG, Ganguly K, Chaudhuri K, Chakrabarty A (2000) The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14:249–251.
- DIMDI – Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (2020) Anatomisch-therapeutisch-chemische Klassifikation mit Tagesdosen, amtlicher ATC-Index mit DDD-Angaben für Deutschland im Jahr 2020.
- Duft M, Tillmann M, Oehlmann J (2003) Ökotoxikologische Sedimentkartierung der großen Flüsse Deutschlands. UBA – Umweltbundesamt. Texte 26/2003.
- Ebert I, Konradi S, Hein A, Amato R (2014) Arzneimittel in der Umwelt - vermeiden, reduzieren, überwachen. UBA – Umweltbundesamt. Hintergrundpapier.
- ECHA – Europäische Chemikalienagentur (2020a) Registrierte Stoffe. O-acetylsalicylic acid. Abrufdatum 28.12.2020. <https://echa.europa.eu/de/information-on-chemicals/registered-substances/-/disreg/substance/100.000.059>.
- ECHA (2020b) Substance infocard Salicylic acid. Abrufdatum 28.12.2020. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.000.648>.
- ECHA (2021) Registrierung. Abrufdatum 20.10.2021. <https://echa.europa.eu/de/regulations/reach/registration>.
- Edmonds JW, Prasain JK, Dorand D, Yang Y, Hoang HD, Vibbert J, Kubagawa HM, Miller MA (2010) Insulin/FOXO signaling regulates ovarian prostaglandins critical for reproduction. *Dev Cell* 19:858–871.
- Fagron – Fagron GmbH & Co. KG (2014) Sicherheitsdatenblatt Naproxen.
- Fent K (2013) Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Frey M, Scheurer M (2020) Validation of the NSAID in vitro assay for biomonitoring of NSAID activities in surface waters. UBA – Umweltbundesamt. Texte 167/2020.
- Garigan D, Hsu A-L, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161:1101–1112.
- Gelbe Liste – Gelbe Liste. Pharmindex (2021) Ethinylestradiol. Abrufdatum 13.10.2021. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Ethinylestradiol_2846.
- Goodman MB (2006) Mechanosensation. *WormBook: the online review of C. elegans biology*: DOI/10.1895/wormbook.1.62.1.
- Goodman MB, Sengupta P (2019) How *Caenorhabditis elegans* senses mechanical stress, temperature, and other physical stimuli. *Genetics* 212:25–51.
- Götz K, Walz A (2017) Arznei für Mensch und Umwelt? Umsetzung der Empfehlungen des Handbuches Kommunikationsstrategien zur Schärfung des Umweltbewusstseins im Umgang mit Arzneimitteln – ein Beitrag zum nachhaltigen Umgang mit Arzneimitteln. UBA – Umweltbundesamt. Texte 18/2017.

- Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF (2013) The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology* 21:201–232.
- Green RE, Newton I, Shultz S, Cunningham AA, Gilbert M, Pain DJ, Prakash V (2004) Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *Journal of Applied Ecology* 41:793–800.
- Harries JE, Sheahan DA, Matthiessen P, Neall P, Rycroft R, Tylor T, Jobling S, Routledge EJ, Sumpter JP (1996) A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ Toxicol Chem* 15:1993–2002.
- Heber D, Imming C (2016) Diclofenac. In: Böckler F, Dill B, Dingerdissen U, Eisenbrand G, Faupel F, Fugmann B, Gamse T, Matissek R, Pohnert G, Sprenger G (Hrsg): *Römpp Online*. Thieme Gruppe.
- Heckmann L-H, Sibly RM, Timmermans MJ, Callaghan A (2008) Outlining eicosanoid biosynthesis in the crustacean *Daphnia*. *Front Zool* 5:11.
- Huscek G, Kregel D (2003) Mengenermittlung und Systematisierung von Arzneimittelstoffen im Rahmen der Umweltprüfung von Human- und Tierarzneimitteln gemäß § 28 AMG einschließlich Anhang. Institut für Umweltschutz und Qualitätssicherung Dr. Kregel. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit Chemikaliensicherheit, Umweltprüfung, UBA-FB-000832.
- IQVIA – IQVIA Commercial GmbH & Co. OHG (2021a) IQVIA Arzneimittelverbrauch (AMV) Sonderstudie.
- IQVIA (2021b) Marktstruktur rezeptfreier Produkte aus Apotheken in 2020. IQVIA Consumer Report Apotheke.
- IQVIA (2022) Einverständnis zur besonderen Nutzung vertragsgegenständlicher, an Martin-Luther-Universität lizenzierter IQVIA-Daten (hier: IQVIA Arzneimittelverbrauch (AMV) Sonderstudie) zur Verwendung als Quelle/Informationsbasis unternehmenseigener Analysen/Angaben/Veröffentlichung. Gestattungsschreiben.
- Kenyon CJ (2010) The genetics of ageing. *Nature* 464:504–512.
- Kern D, Lorenz W (2008) Rückstände ausgewählter Humanarzneimittel in Oberflächenwasserkörpern im Einzugsgebiet Halle (Saale). *Umweltwiss Schadst Forsch* 20:97–101.
- Kęszycka PK, Szkop M, Gajewska D (2017) Overall content of salicylic acid and salicylates in food available on the European market. *J Agric Food Chem* 65:11085–11091.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8897–8901.
- Kim B, Lee J, Kim Y, Lee S-JV (2020) Regulatory systems that mediate the effects of temperature on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurogenet* 34:518–526.

- Klauer B, Aicher C, Bratan T, Eberle U, Hillenbrand T, Kümmerer K, Reuter W, Schiller J, Schulte-Römer N, Schramm E, Tettenborn F, Völker C, Walz A (2020) Arzneimittelrückstände in Trinkwasser und Gewässern. TAB-Arbeitsbericht Nr. 183. Deutscher Bundestag, Ausschusses für Bildung, Forschung und Technikfolgenabschätzung. Drucksache 19/16430.
- Kümmerer K, Schuster A, Längin A, Happel O, Thoma A, Schneider K, Hassauer M, Gartiser S, Hafner C (2011) Identifizierung und Bewertung ausgewählter Arzneimittel und ihrer Metaboliten (Ab- und Umbauprodukte) im Wasserkreislauf. UBA – Umweltbundesamt. Texte 46/2011.
- Kurth R (2008) Die Entwicklung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im zunehmenden europäischen Wettbewerb. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 51:340–344.
- Lamp C, Likar R (2014) Metamizol: Wirkmechanismen, Interaktionen und Agranulozytoserisiko. Der Schmerz 28:584–590.
- Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt (2006) Arzneistoffe in Zu- und Abläufen von kommunalen Kläranlagen des Landes Sachsen-Anhalt (Bericht zum Sondermessprogramm 2002-2004). Fachinformation.
- Leverett D, Merrington G, Crane M, Ryan J, Wilson I (2021) Environmental quality standards for diclofenac derived under the European Water Framework Directive: 1. Aquatic organisms. Environ Sci Eur 33.
- Loos R, Marinov D, Sanseverino I, Napierska D, Lettieri T (2018) Review of the 1st watch list under the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd watch list. Publications Office of the European Union.
- Lublin A, Isoda F, Patel H, Yen K, Nguyen L, Hajje D, Schwartz M, Mobbs C (2011) FDA-approved drugs that protect mammalian neurons from glucose toxicity slow aging dependent on cbp and protect against proteotoxicity. PLoS One 6:e27762.
- Marciniak B (2016) Menge hergestellter, importierter und abgegebener Arzneimittel. E-Mail. 29.02.2016.
- Mattson MP (2008) Hormesis defined. Ageing Res Rev 7:1–7.
- Milz I (2016) Menge hergestellter, importierter und abgegebener Arzneimittel. E-Mail. 18.03.2016.
- Narasimhan SD, Yen K, Bansal A, Kwon E-S, Padmanabhan S, Tissenbaum HA (2011) PDP-1 links the TGF- β and IIS pathways to regulate longevity, development, and metabolism. PLoS Genet 7:e1001377.
- National Center for Biotechnology Information (2020a) PubChem Compound Summary for CID 156391, Naproxen. Abrufdatum 17.12.2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naproxen>.
- National Center for Biotechnology Information (2020b) PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminophen. Abrufdatum 19.12.2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/paracetamol>.

- National Center for Biotechnology Information (2020c) PubChem Compound Summary for CID 3672, Ibuprofen. Abrufdatum 19.12.2020.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ibuprofen>.
- Nentwig G (2006) Arzneimittel als Umweltrisiko? Ökotoxikologische Untersuchung und Risikobewertung für vier in der aquatischen Umwelt nachgewiesene Pharmaka. Dissertation. Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJ, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA (2004) Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427:630–633.
- Page AP, Johnstone IL (2007) The cuticle. *WormBook: the online review of C. elegans biology*: DOI/10.1895/wormbook.1.138.1.
- Pawlowski S (2002) Kombinierte Freiland- und Laboruntersuchungen zur Wirkung endokriner Schadstoffe auf Fische. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Rote Liste (2022) Ibuprofen. Abrufdatum 19.06.2022. <https://www.rote-liste.de/suche/stoff/060815/Ibuprofen>.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 68:141–150.
- Smejkal G, Himali D, Hanneman A, Reinhold V (2006) Breaking the tough cuticle of *Caenorhabditis elegans* using pressure cycling technology and optimized lysis reagents: giving the worms a perm. *Pressure BioScience Inc.*
- SRU – Sachverständigenrat für Umweltfragen (2007) Arzneimittel in der Umwelt, Stellungnahme Nr. 12.
- Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans biology*: DOI/10.1895/wormbook.1.101.1.
- Stone S, Khamashta MA, Nelson-Piercy C (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and reversible female infertility. Is there a link? *Drug Saf* 25:545–551.
- Swan GE, Cuthbert R, Quevedo M, Green RE, Pain DJ, Bartels P, Cunningham AA, Duncan N, Meharg AA, Oaks JL, Parry-Jones J, Shultz S, Taggart MA, Verdoorn G, Wolter K (2006) Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biol Lett* 2:279–282.
- Tiwary E, Hu M, Prasain JK (2021) Sperm-guiding unconventional prostaglandins in *C. elegans*: synthesis and signaling. *Metabolites* 11:853.
- Triebkorn R, Casper H, Scheil V, Schwaiger J (2007) Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Anal Bioanal Chem* 387:1405–1416.
- Tumalski T (1994) Flußmittel zum Weichlöten Patent DE 44 15 527 A1. Publikationsdatum 09.11.1995.
- UBA – Umweltbundesamt (2014) Environmental quality standard datasheet: Diclofenac.

- UBA (2015) Arzneimittel: Nicht in die Toilette und Spüle. Faltblatt.
- UBA (2016) Bioakkumulation in der PBT-Bewertung. Abrufdatum 17.01.2021.
<https://www.umweltbundesamt.de/bioakkumulation-in-der-pbt-bewertung>.
- UBA (2018a) Umweltaspekte bei der Zulassung von Tierarzneimitteln.
 Abrufdatum 03.06.2020. <https://www.umweltbundesamt.de/TAM-zulassung>.
- UBA (2018b) Umweltwirkungen von Tierarzneimitteln. Abrufdatum 20.12.2020.
www.uba.de/TAM-wirkung.
- UBA (2019) The database "Pharmaceuticals in the Environment" - Update and new analysis. Final report. Texte 67/2019.
- UBA (2020a) Arzneimittelwirkstoffe. Abrufdatum 12.02.2022.
<https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/fluesse/zustand/anzneimittelwirkstoffe>.
- UBA (2020b) Beobachtungsliste für Chemikalien in Gewässern. Abrufdatum 05.12.2021.
<https://www.umweltbundesamt.de/themen/beobachtungsliste-fuer-chemikalien-in-gewaessern>.
- UBA (2020c) Prüfung der Umweltwirkung von Arzneimitteln. Abrufdatum 19.08.2021.
<https://www.umweltbundesamt.de/daten/chemikalien/anzneimittelrueckstaende-in-der-umwelt>.
- UBA – Umweltbundesamt, BfArM – Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2017) Gemeinsamer Bericht vom UBA und BfArM über die Prüfung von Handlungsmöglichkeiten zur Minimierung des Eintrages von Humanarzneimitteln (inkl. Rückständen) in das Rohwasser der Trinkwasseraufbereitung.
- Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA (2019) Moving to a world beyond “ $p < 0.05$ ”. The American Statistician 73:1–19.
- Webb S, Ternes T, Gibert M, Olejniczak K (2003) Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. Toxicology Letters 142:157–167.
- WHO – World Health Organization (2021) WHO model list of essential medicines - 22nd list.
- Wünnemann H, Weiß K, Arndt D, Baumann M, Weiß R, Ferling H, Scholz-Göppel K, Bucher K, Feick C, Hartmann G, Kitzing P, Szyja M, Schwaiger J (2020) Umweltqualitätsnormen für Binnengewässer Überprüfung der Gefährlichkeit neuer bzw. prioritärer Substanzen. UBA – Umweltbundesamt. Texte 233/2020.
- Zullini A (1976) Nematodes as indicators of river pollution. Nematol. medit. 4:13–22.

8 Thesen

- Der Arzneimittelverbrauch im Jahr 2020 betrug in Deutschland für Ibuprofen ca. 1212 t, für Metamizol ca. 969 t, für Paracetamol ca. 476 t, für ASS ca. 459 t für Diclofenac ca. 74 t und für Naproxen ca. 34 t.
- Innerhalb von 48 h waren keine akuttoxischen Effekte auf *C. elegans* durch Diclofenac, Kläranlagenablaufwasser oder eine Mischexposition von Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol nachweisbar.
- Diclofenac konnte mit einer Konzentration von 2 mmol/l im Medium die mediane Lebensspanne von *C. elegans* auf 43 % (95 % KI; 0,23-0,81) reduzieren.
- Der Einsatz von *E. coli*, welche während ihrer Kultivierung ebenfalls einer Konzentration von 2 mmol/l Diclofenac ausgesetzt waren (konditionierte *E. coli*), reduzierte, in Kombination mit einer Diclofenac-Konzentration im Medium von 2 mmol/l, die mediane Lebensspanne von *C. elegans* auf 30 % (95 % KI; 0,17-0,55).
- Der Einsatz von konditionierten *E. coli* (2 mmol/l Diclofenac) führte auch in unbelastetem Medium zu einer Reduktion der medianen Lebensspanne von *C. elegans* auf 83 % (95 % KI; 0,44-1,56).
- Kläranlagenablaufwasser führte in beiden Gruppen zu einer Reduktion der medianen Lebensspanne von *C. elegans* auf 91 % (95 % KI; 0,49-1,68 bzw. 0,46-1,81). Eine Mischexposition von Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol verringerte die mediane Lebensspanne von *C. elegans* auf 70-84 % (95 % KI; 0,35-1,39, 0,44-1,61 bzw. 0,43-1,50).
- Diclofenac führte mit zunehmender Konzentration zu einer Verlängerung der Reproduktionsphase von *C. elegans* um mehrere Tage. Höhere Wirkstoffkonzentrationen führten zu einer tendenziell geringeren Gesamtnachkommenzahl. Effekte werden sowohl über das Medium als auch über konditionierte *E. coli* vermittelt.
- Kläranlagenablaufwasser als Abbildung einer realitätsnahen Umgebung mit Mehrfachbelastung und die Mischexposition von Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Paracetamol (jeweils 20 µmol/l) hatten reproduktionstoxisch keinen nachweisbaren Einfluss.
- *C. elegans* kann unter den Bedingungen von Kläranlagenablaufwasser als Modellorganismus dienen.
- Der Einsatz von konditionierten *E. coli* kann Auswirkungen innerhalb einer Nahrungskette abbilden und damit den toxikologischen Kenntnisstand erhöhen.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift