

Untersuchung zur Eignung eines neuen Biotests
mit dem Hühnerembryo für den Nachweis
ausgewählter endokriner Disruptoren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Luzie Jessl
aus Frankfurt am Main

Frankfurt (2023)

(D 30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: **Prof. Dr. Sven Klimpel**
Goethe-Universität Frankfurt am Main
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität
Integrative Parasitologie und Tierphysiologie
Max-von-Laue-Str. 13, D-60438 Frankfurt am Main

Gutachter: **Prof. Dr. Jörg Oehlmann**
Goethe-Universität Frankfurt am Main
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität
Aquatische Ökotoxikologie
Max-von-Laue-Str. 13, D-60438 Frankfurt am Main

Prof. Dr. Dr. h.c. Henner Hollert
Goethe-Universität Frankfurt am Main
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität
Evolutionsoökologie und Umwelttoxikologie
Max-von-Laue-Str. 13, D-60438 Frankfurt am Main

Datum der Disputation: 22.01.2024

© Luzie JESSL

August 2023

INHALT

INHALT	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABSTRACT	VI
ZUSAMMENFASSUNG	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Endokrin wirksame Chemikalien	1
1.2 Endokrine Disruption bei Mensch und Tier	3
1.3 OECD-Prüfrichtlinienprogramm	4
1.4 REACH-Verordnung und ihre Konsequenzen	5
1.5 Tierversuchsmethoden	7
1.6 Tierversuchersatzmethoden	10
1.7 Entwicklung einer Tierversuchersatzmethode mit dem Hühnerembryo	11
1.8 Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos	13
1.9 Ziele der Arbeit	19
2 DISKUSSION	22
2.1 Normalentwicklung des Hühnerembryos	22
2.1.1 Morphometrische Endpunkte	23
2.1.2 Gonadale Geschlechtsdifferenzierung	26
2.2 Entwicklung des Hühnerembryos unter Einfluss von ED	27
2.2.1 Wirkung von ED auf morphometrische Endpunkte	28
2.2.2 Wirkung von Estrogen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung	30
2.2.3 Wirkung von Antiestrogen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung	34
2.2.4 Wirkung von Androgen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung	39
2.2.5 Wirkung von Antiandrogen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung	43
2.3 Hühnerembryo als Testsystem	45

3	FAZIT UND AUSBLICK.....	55
4	LITERATUR.....	57
	ANHANG.....	71
	A.1 The domestic fowl (<i>Gallus gallus domesticus</i>) embryo as an alternative for mammalian experiments – Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals	71
	A.2 Effects of estrogens and antiestrogens on gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	85
	A.3 Morphological and transcriptomic effects of endocrine modulators on the gonadal differentiation of chicken embryos: The case of tributyltin (TBT)	112
	A.4 No effects of the antiandrogens cyproterone acetate (CPA), flutamide and <i>p,p'</i> -DDE on early sexual differentiation but CPA-induced retardation of embryonic development in the domestic fowl (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	123
	A.5 Curriculum vitae.....	157
	A.6 Publikationsliste und Tagungsbeiträge.....	160
	A.7 Danksagung	161

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Das Urogenitalsystem männlicher (links, ZZ) und weiblicher (rechts, ZW) Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 20 der embryonalen Entwicklung 15

Abbildung 2: Rechter und linker Hoden (1a-c) bzw. rechtes und linkes Ovar (2a-c) unbehandelter Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung..... 17

Abbildung 3: Eigewicht sowie Länge von Schädel, Laufbein (Tarsometatarsus) und Elle (Ulna) unbehandelter Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung..... 25

Abbildung 4: Missbildungen bei Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) bis Tag 19 der embryonalen Entwicklung 29

Abbildung 5: Effekte der In-ovo-Exposition gegenüber Terbutryn (170 µg/g Ei) auf die rechte und linke Gonadenfläche (A) sowie die Cortexdicke und den prozentualen Anteil an *Tubuli seminiferi* der linken Gonade (B) von Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung 35

Abbildung 6: Effekte der In-ovo-Exposition gegenüber Tributylphosphat (TBP; 5, 50 oder 85 µg/g Ei) auf die linke und rechte Gonadenfläche (A) sowie die Cortexdicke und den prozentualen Anteil an *Tubuli seminiferi* der linken Gonade (B) von Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung 37

Abbildung 7: Effekte der In-ovo-Exposition gegenüber Trenbolon (T; 1, 3,3 oder 10 ng/g Ei) und 17α-Methyltestosteron (MT; 0,6 oder 10 ng/g Ei) auf die rechte und linke Gonadenfläche (A, B) sowie die Cortexdicke und den prozentualen Anteil an *Tubuli seminiferi* der linken Gonade (C) von Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung..... 42

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3R	<i>refine, reduce, replace</i>
A	Androgen
AA	Antiandrogen
AE	Antiestrogen
AMH	Anti-Müller-Hormon
AR	Androgenrezeptor
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BPA	Bisphenol A
BPAF	Bisphenol AF
BPF	Bisphenol F
BPS	Bisphenol S
CAS	Chemical Abstracts Service
CF	<i>Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors</i>
CPA	Cyproteronacetat
DDE	Dichlordiphenyldichlorethen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DES	Diethylstilbestrol
DMRT1	<i>Doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Estrogen
E1	Entwicklungstag 1
E ₂	17 β -Estradiol
ECHA	Europäische Chemikalienagentur
ED	Endokriner Disruptor
EE ₂	17 α -Ethinylestradiol
ER	Estrogenrezeptor
FOXL2	Transkriptionsfaktor <i>Forkhead box protein L2</i>
K _{ow}	n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LOEWE	Hessische Landes-Offensive zur Entwicklung wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz
MBP	4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene
MD	<i>Mullerian Duct</i> (Müllerscher Gang)

mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MT	Methyltestosteron
NC	<i>Negative Control</i> (Negativkontrolle)
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung)
PGC	<i>Primordial Germ Cell</i> (Primordiale Keimzelle)
PPT	Propylpyrazoletriol
REACH	Registrierung, Evaluierung, Autorisierung und Restriktion von Chemikalien
SC	<i>Solvent Control</i> (Lösemittelkontrolle)
SERM	Selektiver Estrogenrezeptor-Modulator
SOX9	Transkriptionsfaktor SOX-9
SRY-Gen	<i>Sex determining region of Y-Gen</i>
TA	Trenbolonacetat
TBP	Tributylphosphat
TBT	Tributylzinn
TP	Testosteronpropionat
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
XX	homogametische Geschlechtschromosomen der Säugetiere
XY	heterogametische Geschlechtschromosomen der Säugetiere
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch
ZW	heterogametische Geschlechtschromosomen der Vögel
ZZ	homogametische Geschlechtschromosomen der Vögel

ABSTRACT

Among the chemicals in constant use worldwide, there are not only compounds with acute toxicity, but also compounds with effects on the endocrine system. In particular, the disruption of sex differentiation and reproduction, triggered by natural or synthetic chemicals with endocrine potential, so-called endocrine disruptors (ED), play a major role. These chemicals can enter the environment through different pathways. Since the mid-20th century, more and more cases have been reported in which anthropogenic chemicals have affected plant and animal life. There are numerous findings on endocrine disruption in humans and animals.

In the context of hazard and risk assessment, a large number of harmonized test guidelines are already available for the identification and evaluation of (potential) ED. So far, for the registration of chemicals *in vivo* studies are indispensable to detect the totality of potential interactions of ED with the endocrine system. Investigating the endocrine potentials in higher vertebrates, especially rodent- and bird-based test systems play an important role. However, these test systems are time-, cost- and personnel-intensive. In addition, a high number of laboratory animals are required for these tests which involve a variety of issues such as ethical concern. A very interesting and promising approach to reduce animal testing is the development of a standardized procedure for testing potential ED in avian embryos. Bird based *in ovo* models represent a compromise between *in vitro* and *in vivo* assays. In addition, the most sensitive developmental stage for ED in the life of an organism, is considered - the developing embryo.

The objective of the present work was the development and suitability testing of a bioassay for the detection of ED based on the embryo of domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). The resulting bioassay is intended to be used as an alternative method to previously established rodent- and bird-based test systems for investigating the effects of hormonally active substances on sex differentiation in higher vertebrates.

The studies performed in the present work included both the characterization of the normal development of the chicken embryo, unaffected by ED, and the morphological-histological alterations of the gonads of substance-exposed embryos. For the investigation of substance-related effects, which are the main focus of the present work, embryos were exposed to different (anti)estrogenic and (anti)androgenic substances. Exposure to the xeno-estrogens bisphenol A (BPA) and 17 α -ethinylestradiol (EE₂) resulted in the development of ovotestes in males, whereas females formed an ovary with a significantly narrower cortex. Exposure to the antiestrogens fulvestrant and tamoxifen resulted in no effects on the gonads of male embryos,

whereas EE₂-induced feminization of male gonads could be effectively antagonized by both substances. Tamoxifen-treated females formed significantly narrower left gonads with a malformed cortex. Exposure to androgenic tributyltin (TBT) and 17 α -methyltestosterone (MT) resulted in no effects on male embryos, while female embryos showed anatomically virilized gonads and a reduction of the left gonadal cortex. Exposure to antiandrogenic cyproterone acetate (CPA), flutamide and *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE) had no effect on gonadal sex differentiation of male and female chicken embryos.

These results show that the embryo of *G. gallus domesticus* is sufficiently sensitive to a range of endocrine disrupting and reproductive toxic chemicals. Anatomical and histological changes in the gonads may therefore be useful as biomarkers of ED effects in birds. However, the endpoints studied relate to apical effects and do not provide mechanistic information on the compounds studied. The chicken embryo-based bioassay is a useful addition to the existing OECD test battery. It is particularly characterized by its cost-effectiveness and the simple test implementation. Compared to established rodent- or bird-based test systems, the comparatively short test duration of 19 days allows rapid substance screening. In the context of (eco)toxicological hazard and risk assessment of chemicals, the proposed chicken embryo-based test system could help to consume fewer test animals in the future.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter den weltweit in ständigem Gebrauch befindlichen Chemikalien befinden sich nicht nur Verbindungen mit akuter toxischer Wirkung, sondern auch solche mit Wirkung auf das endokrine System. Eine große Rolle spielt hier vor allem die Störung der Geschlechtsdifferenzierung und der Reproduktion, ausgelöst durch natürliche oder synthetische Chemikalien mit endokrinem Potential, sogenannte endokrine Disruptoren (ED). Diese Chemikalien können über unterschiedliche Eintragspfade in die Umwelt gelangen. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts werden mehr und mehr Fälle bekannt, in denen anthropogene Chemikalien die Pflanzen- und Tierwelt belasten, darunter zahlreiche Befunde zu Störungen des Hormonsystems von Mensch und Tier.

Im Rahmen der Gefahren- und Risikobewertung steht bereits eine Vielzahl harmonisierter Prüfrichtlinien für die Identifizierung und Evaluierung der Effekte von (potentiellen) ED zur Verfügung. Um die Gesamtheit aller potentiellen Interaktionen von ED mit dem Hormonsystem detektieren zu können, ist die In-vivo-Untersuchung an Vertebraten in der Chemikalienregistrierung bisher unabdingbar. Bei der Untersuchung endokriner Potentiale in höheren Vertebraten spielen vor allem nager- und vogelbasierte Testsysteme eine wichtige Rolle. Diese bergen jedoch einen hohen zeitlichen, personellen und finanziellen Aufwand und erfordern eine massive Zahl an Versuchstieren, die für diese Tests benötigt werden. Darüber hinaus beinhalten Tierversuche eine Vielzahl von Problemen einschließlich ethischer Bedenken, die sich als Konsequenz der Tierhaltung unter Versuchsbedingungen ergeben. Ein sehr interessanter und vielversprechender Ansatz zur Reduktion von Tierversuchen ist die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens für die Untersuchung potentieller ED in Vogelembryonen. Auf Vogelembryonen basierende In-ovo-Modelle stellen einen Mittelweg zwischen In-vitro- und In-vivo-Testsystemen dar. Mit dem Vogeleitest wird der sich entwickelnde Embryo, das für ED sensitivste Entwicklungsstadium im Leben eines Organismus, berücksichtigt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Eignungsuntersuchung eines auf dem Embryo des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) basierenden Testsystems für den Nachweis von ED. Das resultierende Testsystem soll als Alternativmethode zu bisher etablierten nager- und vogelbasierten Testsystemen für die Untersuchung der Effekte hormonell aktiver Substanzen auf die Geschlechtsdifferenzierung in höheren Wirbeltieren eingesetzt werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Arbeiten umfassten sowohl die Charakterisierung der Normalentwicklung des Hühnerembryos, unbeeinflusst durch ED, als auch die morphologisch-histologischen Veränderungen der Gonaden von substanzexponierten Embryonen. Für die Untersuchung substanzbedingter Effekte, welche den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellen, wurden die Embryonen gegenüber verschiedenen (anti)estrogenen und (anti)androgenen Substanzen exponiert. Unter Einfluss der Estrogene Bisphenol A (BPA) und 17α -Ethinylestradiol (EE_2) entwickelten sich die Keimdrüsen der Männchen zu Ovotestes, während Weibchen ein Ovar mit deutlich schmalere Cortex ausbildeten. Unter Einfluss der Antiestrogene Fulvestrant und Tamoxifen blieben Effekte auf die Gonaden männlicher Embryonen aus, eine durch das potente Estrogen EE_2 hervorgerufene Feminisierung männlicher Gonaden konnte durch beide Substanzen jedoch effektiv antagonisiert werden. Weibchen bilden unter Einfluss von Tamoxifen deutlich schmalere linke Gonaden mit einem missgebildeten Cortex aus. Unter Einfluss der Androgene Tributylzinn (TBT) und 17α -Methyltestosteron (MT) blieben die Effekte auf männliche Embryonen aus, während die Weibchen anatomisch virilisierte Gonaden und eine Reduktion des linken gonadalen Cortex aufwiesen. Allein die untersuchten antiandrogenen Versuchssubstanzen Cyproteronacetat (CPA), Flutamid und *p,p'*-Dichlorodiphenyldichloroethen (*p,p'*-DDE) hatten keinen Effekt auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung männlicher und weiblicher Hühnerembryonen.

Es konnte gezeigt werden, dass der Embryo von *G. gallus domesticus* einen sensitiven Organismus innerhalb des Tierreichs darstellt und hinreichend sensitiv auf eine Reihe von endokrin wirksamen und reproduktionstoxischen Chemikalien reagiert. Anatomische und histologische Änderungen der Gonaden können daher als Biomarker für die Wirkung von ED bei Vögeln nützlich sein. Die untersuchten Endpunkte beziehen sich jedoch auf apikale Effekte und liefern keine mechanistischen Informationen zu den untersuchten Substanzen. Der Hühnereitest ist eine sinnvolle Ergänzung zur bestehenden OECD-Testbatterie und zeichnet sich besonders durch seine kostengünstige und einfache Handhabung im Labor sowie einfach durchzuführende Tests aus. Durch die vergleichsweise kurze Versuchsdauer von nur 19 Tagen ist ein schnelles Substanzscreening möglich, welches zeitlich deutliche Vorteile gegenüber den etablierten nager- und vogelbasierten Testsystemen hat. Als Alternative zu bisherigen Assays könnte der vorgeschlagene Hühnereitest dazu beitragen, im Rahmen der (öko)toxikologischen Gefährdungs- und Risikobewertung von Chemikalien künftig weniger Versuchstiere zu verwenden.

1 EINLEITUNG

1.1 Endokrin wirksame Chemikalien

Derzeit sind laut *Chemical Abstracts Service (CAS, 2023)* weltweit rund 204 Millionen organische und anorganische Substanzen gelistet, im Einstufungs- und Kennzeichnungsverzeichnis der *Europäischen Chemikalienagentur (ECHA)* sind rund 219.000 Stoffe verzeichnet (*ECHA, 2023a*). Wie viele dieser Substanzen regelmäßig in der Europäischen Union verwendet werden, ist nicht bekannt. Diese Chemikalien können über unterschiedliche Eintragspfade in die Umwelt gelangen, beispielsweise über Abwässer, atmosphärische Deposition von Schwebstoffen oder durch Abschwemmung von Böden und Oberflächen. Unter diesen Substanzen befinden sich neben Verbindungen mit einer unspezifischen akuten und chronischen toxischen Wirkung auch solche mit spezifischer Wirkung auf das endokrine System. So sind in den letzten Jahrzehnten Reproduktionsstörungen bei Tier und Mensch ebenso in den Fokus von Wissenschaft und Gesellschaft gerückt wie die chemischen Substanzen, die im Verdacht stehen, entsprechende Effekte auszulösen. Eine große Rolle spielt hier vor allem die Störung der Geschlechtsdifferenzierung und der Reproduktion, ausgelöst durch natürliche oder synthetische Chemikalien mit endokrinem Potential. Diese Substanzen oder Substanzmischungen werden auch Endokrine Disruptoren (ED) genannt. Nach der in der *Europäischen Union (European Commission, 2016)* und durch *Solecki et al. (2017)* anerkannten Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO), ist ein ED eine exogene Substanz oder eine Mischung von Stoffen, die die Funktion(en) des endokrinen Systems verändert und folglich gesundheitsschädliche Wirkungen in einem intakten Organismus, seiner Nachkommenschaft oder einer (Sub-)Population hervorruft (*WHO/IPCS, 2002*). Daneben existieren weitere anerkannte Definitionen. Nach der Definition der *Weybridge Conference (1996)* ist ein ED ein exogener Stoff, welcher als Folge von Veränderungen der endokrinen Funktion gesundheitsschädliche Wirkung in einem intakten Organismus oder seiner Nachkommenschaft verursacht. Nach der Definition der *U.S. Environmental Protection Agency* wird ein ED als exogener Wirkstoff charakterisiert, welcher Produktion, Sekretion, Transport, Metabolisierung, Bindung oder Elimination natürlicher Hormone im Körper beeinträchtigt, die für die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Regulierung von Entwicklungsprozessen verantwortlich sind (*Kavlock et al., 1996*).

Gegenwärtig sind rund 1.400 Substanzen identifiziert, die laut wissenschaftlicher Forschung Hinweise auf endokrine Störungen liefern (*TEDX, 2018*). Eine Großzahl der in die Umwelt eingebrachten ED ist anthropogenen Ursprungs, und ihre Quellen sowie Eintragspfade sind sehr unterschiedlich. Während einige ED beispielsweise aus Körperpflegemitteln stammen und über das Abwasser in die Umwelt gelangen, stellen auch Pharmazeutika eine nicht zu vernachlässigende Quelle dar, da diese von Mensch und Tier nur zum Teil verstoffwechselt werden und über deren Ausscheidungen ins Abwasser gelangen. Auch Umweltchemikalien wie Flammschutzmittel und Weichmacher oder aber landwirtschaftlich genutzte Verbindungen wie Pflanzenschutzmittel enden schließlich in der Umwelt. Die Hauptsenke der ED sind Oberflächengewässer, von dort aus ist nicht nur ein Transport über weite Strecken möglich, sondern auch eine Ablagerung im Sediment oder ein Versickern in das Grundwasser. Das Schicksal und der Verbleib eines ED ist dabei von seinen Stoffeigenschaften abhängig. ED sind häufig so konstruiert, dass sie eine lange Halbwertszeit aufweisen, was für ihre industrielle oder pharmazeutische Anwendung von entscheidendem Vorteil ist. So sind beispielsweise viele Arzneimittel biologisch schwer abbaubar, da diese hochwirksamen Substanzen intakt an ihrem Zielort im Körper ankommen und dort ihre Wirkung entfalten sollen. Gelangen solche persistenten Verbindungen jedoch in die Umwelt, können sie dort lebende Organismen nachhaltig schädigen. Eine Aufnahme in den Organismus kann über Atmung, Nahrung oder die Körperoberfläche erfolgen (*Matthiessen, 2013*). Da persistente ED in der Regel einen hohen n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow} -Wert) haben und damit hydrophobe und lipophile Eigenschaften aufweisen, lagern sie sich bevorzugt in Fettgewebe ein und reichern sich mit zeitlichem Versatz entlang der Nahrungskette an. Nach Aufnahme in den Organismus sind ED in der Lage, auf potentiell jedes hormongesteuerte System Einfluss zu nehmen. Ihre Wirkung können sie durch verschiedene Mechanismen entfalten. So löst die direkte Beeinflussung mittels Nachahmung der biologischen Aktivität eines natürlichen Hormons durch die Bindung an Hormonrezeptoren eine Antwort aus (agonistischer Effekt). Die Bindung an einen Hormonrezeptor ohne dessen Aktivierung verhindert dagegen die Bindung des natürlichen Hormons an den entsprechenden Rezeptor und damit einen normalen Signalweg (antagonistischer Effekt). Auch ein indirekter Einfluss durch Beeinflussung von Hormontransportproteinen oder metabolischer Prozesse, welche die Bioverfügbarkeit, Synthese, Degradation und Sekretion von natürlichen Hormonen beeinflussen, ist möglich.

1.2 Endokrine Disruption bei Mensch und Tier

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts werden mehr und mehr Fälle bekannt, in denen unterschiedlichste anthropogene Chemikalien die Pflanzen- und Tierwelt belasten und letztlich auch vor dem Menschen nicht halt machen. Die Befunde zu Störungen des menschlichen Hormonsystems sind zahlreich. So wird bereits seit den 1940er Jahren eine Verminderung der Spermienquantität und -qualität nordamerikanischer und europäischer Männer verzeichnet (*Carlsen et al., 1992; Gore et al., 2015; Swan et al., 2000*), als deren Ursache unter anderem ED diskutiert werden. Außerdem wird angenommen, dass ED einen Beitrag zum Anstieg der Erkrankungsraten hormonabhängiger Krebsarten, wie Brust-, Hoden-, Prostata- oder Schilddrüsenkrebs leisten (*Gore et al., 2015*). Ein besonders drastisches Beispiel für die Auswirkungen hormonell wirksamer chemischer Substanzen auf die menschliche Gesundheit lässt sich anhand der estrogenen Substanz Diethylstilbestrol (DES) zeigen, welche schwangeren Frauen bis in die 1970er Jahre als Medikament gegen Fehlgeburten verschrieben wurde. Während die behandelten Mütter keine langfristigen Nebenwirkungen erfuhren, gab es jedoch signifikante Auswirkungen auf deren Nachkommenschaft. Erst nachdem sich die Fälle eines sonst für junge Frauen zwischen dem 15. und 22. Lebensjahr unüblichen Vaginalkarzinoms häuften, kam man dem Grund dafür auf die Spur, nämlich der Behandlung deren Mütter mit dem hormonell wirksamen Medikament (*Herbst et al., 1971*).

Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts wurden erste Reproduktionsstörungen bei Wildtieren bekannt, die durch in die Umwelt gelangte anthropogene Verbindungen hervorgerufen wurden. Anfang der 1960er erregte die Biologin Rachel Carson mit ihrem Buch „Stummer Frühling“ (Originaltitel: „Silent Spring“) große Aufmerksamkeit, als sie über das Singvogelsterben als Folge des ungebremsten Pestizidgebrauchs schrieb. Neben der sachlichen Beschreibung der Wirkweise verschiedener Pestizide und deren negative Auswirkung auf diverse Vogelarten führte sie den Gedanken eines Umweltproblems durch anthropogene Stoffe weiter und malte eine dunkle Zukunft für Mensch und Natur (*Carson, 1962*). Daneben wurden durch das Insektizid Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und seine Abbauprodukte hervorgerufene Entwicklungsstörungen und Eischalenverdünnung bei See- und Greifvögeln bekannt (*Fry, 1995; Ratcliffe, 1970*). Das Insektizid war über Oberflächenabfluss von den behandelten Feldern in den Wasserkörper gelangt und hatte sich über Jahre hinweg entlang der Nahrungskette angereichert, an deren Ende die carnivoren Vögel standen. In Folge dessen kam es zu einem Einbruch der Populationen, deren Bestände sich erst nach Einschränkung der Anwendung des Insektizids Anfang der 1970er wieder erholten.

Ereignisse wie diese sensibilisierten die breite Öffentlichkeit für anthropogene Substanzen und deren schädliche Wirkung auf die belebte Umwelt. Aus diesem neuen Bewusstsein entstand schließlich die weltweite Umweltbewegung, die bis heute anhält. Auch die Ökotoxikologie, die sich als interdisziplinäre Wissenschaft aus Ökologie, Toxikologie und Umweltchemie zusammensetzt und sich mit der Auswirkung von Chemikalien auf Ökosysteme beschäftigt (Fent, 2013), entwickelte sich zu dieser Zeit. Der Schwerpunkt der ökotoxikologischen Forschung liegt auf Untersuchung, Vorhersage und Verbleib von Schadstoffen in der Umwelt sowie ihrer Bioverfügbarkeit, Aufnahme in den Organismus, Toxikokinetik und möglicher Auswirkungen. Die ökotoxikologische Risikobewertung ist ein wichtiger Bestandteil der geltenden Rechtsvorschriften für die Herstellung und Verwendung von Chemikalien. Neben der Untersuchung der Wirkung auf individuelle Organismen befasst sich die Ökotoxikologie auch mit den Auswirkungen auf Ebene ganzer Populationen (Farhat et al., 2020).

1.3 OECD-Prüfrichtlinienprogramm

Mit derzeit 38 Mitgliedsstaaten weltweit ist es Ziel der *Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung* (engl.: *Organisation for Economic Co-operation and Development*; OECD), das Leben der Menschen in wirtschaftlicher sowie sozialer Hinsicht zu verbessern. Eine ihrer Aufgaben ist die Schaffung internationaler Standards für die Sicherheit von Chemikalien, inklusive Pestiziden und Industriechemikalien für Mensch und Umwelt. Zu diesem Zweck stellt die OECD eine Sammlung von beinahe 200 international anerkannten und standardisierten Richtlinien für die Testung von Chemikalien bereit, die in fünf Teilbereiche untergliedert ist: 1) physikalisch chemische Eigenschaften, 2) Effekte auf biotische Systeme, 3) Degradation und Bioakkumulation, 4) Auswirkungen auf die Gesundheit und 5) weitere Test-Richtlinien (OECD, 2023b). Diese Richtlinien repräsentieren Standardmethoden, die von Regierung, Industrie, Hochschulen und unabhängigen Laboratorien für die Prüfung und Bewertung von Substanzen verwendet werden können. Die grundlegende Idee hinter diesem Konzept ist nicht nur die bessere Vergleichbarkeit der durch die Befolgung des Protokolls einer Testrichtlinie sowie durch Einhaltung der Guten Laborpraxis erhaltenen Chemikaliendaten, sondern auch die gegenseitige Akzeptanz dieser Daten durch die Mitgliedsstaaten. Obwohl viele landwirtschaftlich genutzte Chemikalien wie Pestizide und einige Industriechemikalien bereits umfassende toxikologische Untersuchungen durchlaufen haben, sind diese Prüfungen größtenteils unzureichend für die Beurteilung einer möglichen Wechselwirkung dieser Chemikalien mit dem endokrinen System. Um eine profunde Beurteilung und Charakterisierung des Risikos für Mensch und Umwelt vornehmen zu können, ist die

Etablierung eines standardisierten und ausreichend empfindlichen, umfassenden Testprogramms für die sichere Identifizierung endokriner Chemikalien unverzichtbar. Aus diesem Grund erarbeitete die OECD ein Programm, das bei der Testung und Risikobewertung von Chemikalien auch endokrine Potenziale abdeckt. Hierbei sollen unter anderem Entwicklungs- und Reproduktionstests mit Fischen, Vögeln, Amphibien und Wirbellosen durchgeführt werden. Seit 1997 ist die Entwicklung und Validierung einer Reihe neuer harmonisierter Prüfrichtlinien für die Testung und Regulation von ED eine Priorität dieses Programms. 2002 stellte die OECD das *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors* (CF) vor, welches Testmethoden für die Identifizierung und Evaluierung von ED vorschlägt und verschiedene In-silico-, In-vitro- und In-vivo-Methoden in fünf Stufen nach aufsteigender Komplexität unterteilt. Diese Stufen liefern den Rahmen für die Testung und Bewertung der Effekte von ED sowie potentieller ED und berücksichtigen vor allem das estrogene und androgene System sowie das Thyroid-System. Stufe 1 befasst sich mit Hilfsmitteln für die Einsortierung und Priorisierung von Substanzen, basierend auf existierenden Informationen, wie ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften oder der Belastung von Mensch und Umwelt durch ihre Freisetzung. Die folgenden Stufen enthalten Prüfungen, die mechanistische Daten *in vitro* (Stufe 2) liefern, sowie Daten zu einfachen (Stufe 3) und multiplen (Stufe 4) endokrinen Mechanismen und Effekten *in vivo*. Stufe 5 stellt schließlich Hilfsmittel für die Untersuchung *in vivo* bereit, die Effektdaten, vermittelt durch endokrine und andere Mechanismen, liefert. Generell soll Stufe 5 zur Risikobeurteilung von Chemikalien inklusive ED beitragen, wobei die Untersuchung und Identifizierung von Wirkmechanismen zwar vorgesehen, aber nicht Pflicht ist. Ein aktualisiertes CF, das neben bestehenden Prüfrichtlinien auch Nicht-OECD-Testverfahren und Prüfrichtlinien, die nicht speziell für das Testen von Chemikalien auf endokrine Störung entwickelt wurden, enthält, wurde 2012 verabschiedet und 2018 aktualisiert (OECD, 2012a, 2018c).

1.4 REACH-Verordnung und ihre Konsequenzen

Besondere Bedeutung erhalten die von der OECD vorgeschlagenen Testrichtlinien für die Ausgestaltung des europäischen Programmes zur *Registrierung, Evaluierung, Autorisierung und Restriktion von Chemikalien* (REACH). Gegenstand der Chemikalienordnung REACH ist es, nach dem Vorsorgeprinzip ein hohes Schutzniveau für Gesundheit und Umwelt zu gewährleisten. Dabei sollen nicht nur sichere Produkte und Prozesse in der chemischen Industrie gefördert, sondern auch besonders besorgniserregende Stoffe substituiert werden. Standardisierte Verfahren und Methoden sollen dabei für eine harmonisierte Informationsbasis

über alle in der EU in Umlauf befindlichen Chemikalien sorgen. Nach altem Chemikalienrecht lag die Zuständigkeit der Sicherheitsprüfung von Chemikalien bei den Behörden der einzelnen Länder. Es gab keine methodisch erhobenen Chemikaliendaten, die produzierten Stoffe waren zum Teil ungleich reguliert, und die Hersteller mussten fehlende Daten nur bei Hinweis auf ein Risiko für Mensch und Umwelt liefern. Um diese Missstände zu beheben, trat im Jahr 2007 schließlich die REACH-Verordnung (Verordnung (EG) Nr. 1907/2006) (*Europäisches Parlament, 2006*) in Kraft, welche zu einer Beweislastumkehr führte, da die Verantwortung zur Chemikalienprüfung fortan nicht mehr bei der zuständigen Behörde, sondern bei der Industrie liegt. So sollten bis 2018 alle vor dem Jahr 1981 auf dem Markt befindlichen Altstoffe, deren Produktionsvolumen eine Tonne pro Jahr übersteigt, nach aktuellen Richtlinien neu bewertet und fehlende Daten nachgereicht werden. Da das Schließen von Datenlücken nach aktuellen Prüfrichtlinien jedoch eine große Zahl toxikologischer Untersuchungen beinhaltet, ist die Konsequenz der REACH-Verordnung ein steigender Bedarf an einer Vielzahl von Tierversuchen. Gleichzeitig soll nach REACH jedoch zunehmend auf Tierversuche verzichtet werden. Auch die Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere sieht vor, als endgültiges Ziel vollständig von Tierversuchen abzusehen (*Europäisches Parlament, 2010*).

Die *Europäischen Kommission* rechnete für die Zeitspanne der vollständigen Umsetzung von REACH (2007-2018) mit einem Bedarf von im besten Fall 2,1 Millionen Versuchstieren (*Van der Jagt et al., 2004*). Verschiedene Studien kalkultierten mit deutlich höheren Bedarfsmengen. So rechnet eine Studie aus Großbritannien mit einem Bedarf an 12,8 Millionen Versuchstieren (*Institute for Environment and Health, 2001*). Die Studie von *Hartung and Rovida (2009)* ergab im Hinblick auf die Zahl der vorregistrierten Stoffe im besten Fall einen europaweiten Bedarf von 54 Millionen Versuchstieren. Nachdem die endgültige Frist für die Registrierung der verbliebenen Altstoffe unter REACH 2018 ablief, resümierte eine im selben Jahr veröffentlichte Studie von *Taylor (2018)*, dass von 2009 bis 2016 knapp 2,2 Millionen Tiere für die REACH-Registrierung verwendet wurden. Obwohl die bis 2018 registrierten Stoffe in dieser Studie noch nicht berücksichtigt wurden, waren die ursprünglich von der Europäischen Union kalkulierten Mengen an Versuchstieren bereits überschritten. Die enorme Zahl an konsumierten und zu konsumierenden Tieren für toxikologische Untersuchungen ist schon aus Sicht des Tierwohls inakzeptabel, sodass sich seit Langem die Frage nach akzeptablen und brauchbaren Alternativen aufdrängt. Wissenschaftlich betrachtet ist der vollständige Ersatz von Tierversuchen jedoch eine große Herausforderung.

1.5 Tierversuchsmethoden

Bisher steht eine Anzahl an OECD-Prüfrichtlinien für die Bestimmung von Substanzen zur Verfügung, die verschiedene trophische Ebenen und Umweltmedien abdecken. Bei den Wirbellosen werden für das Medium Boden vor allem Tests mit Organismen wie Collembolen, Nematoden, Milben oder dem Regenwurm angeboten, für den aquatischen Lebensraum steht eine Reihe an Organismen wie Schnecken und Daphnien zur Verfügung. Bei den niederen Vertebraten werden vor allem fischbasierte Tests zu Reproduktion und Entwicklung und Tests zur Entwicklung und Metamorphose von Amphibien und deren Larven angeboten, aber auch verschiedene höhere Vertebraten, wie Vögel und Nagetiere, spielen eine wichtige Rolle bei der Untersuchung des endokrinen Potentials einer Substanz. So basieren die beiden klassischen Tests für die Untersuchung (anti)estrogener und (anti)androgener Wirkungen, namentlich uterotropher Assay (OECD TG 440) und Hershberger-Assay (OECD TG 441) auf der Verwendung von juvenilen oder adulten Ratten und Mäusen.

Der uterotrophe Bioassay (OECD TG 440) ist ein Kurzzeit-Screeningtest, der auf der Zunahme des Uterusgewichts oder einer uterotrophen Reaktion basiert. Bewertet wird die Fähigkeit einer Chemikalie, biologische Aktivitäten auszulösen, die mit Agonisten oder Antagonisten natürlicher Estrogene übereinstimmen. Voraussetzung für den uterotrophen Assay ist ein östrogenempfindlicher Zustand der Versuchstiere, wobei sowohl unreife Weibchen (nach dem Abstillen und vor der Pubertät) als auch junge adulte Weibchen nach der Ovariectomie (mit ausreichender Zeit für die Rückbildung des Uterusgewebes) in Frage kommen. Die Prüfsubstanz wird täglich über einen Zeitraum von mindestens drei aufeinanderfolgenden Tagen oral oder subkutan verabreicht und die Tiere etwa 24 Stunden nach der letzten Dosis sezziert. Eine statistisch signifikante Zunahme des mittleren Uterusgewichts einer Testgruppe zeigt eine positive Reaktion in diesem Bioassay an (OECD, 2007b).

Der Hershberger Bioassay (OECD TG 441) ist ein Kurzzeit-Screeningtest, der auf der Zu- oder Abnahme verschiedener akzessorische Gewebe des männlichen Fortpflanzungstrakts basiert, im Einzelnen die ventrale Prostata, die Samenblase, der *Musculus levator ani-bulbocavernosus*, die paarigen Cowper-Drüsen und der *Glans penis*. Bewertet wird die Fähigkeit einer Chemikalie, biologische Aktivitäten auszulösen, die mit Androgen-Agonisten, -Antagonisten oder 5 α -Reduktase-Hemmern übereinstimmen. Voraussetzung für den Hershberger-Assay sind Versuchstiere mit minimaler endogener Androgenproduktion, was durch Verwendung kastrierter Tiere (mit ausreichender Zeit für die Rückbildung des Gewebes) erreicht wird. Die Prüfsubstanz wird täglich über einen Zeitraum von zehn aufeinanderfolgenden Tagen oral oder

subkutan verabreicht und die Tiere etwa 24 Stunden nach der letzten Dosis seziiert. Eine statistisch signifikante Zunahme des Gewichts von zwei oder mehr Zielorganen zeigt eine positive Reaktion für eine potentiell androgene Wirkung an. Ein statistisch signifikanter Rückgang des Gewichts von zwei oder mehr Zielorganen in den Gruppen mit Prüfsubstanz und dem potenten Referenzandrogen Testosteronpropionat (TP) zeigt eine positive Reaktion für eine potentiell antiandrogene Wirkung an (*OECD, 2009*).

Da es sich bei beiden Testsystemen um Kurzzeit-Screening-Tests handelt, kann es als durchaus kritisch betrachtet werden, dass das für endokrin wirksame Substanzen empfindlichste Lebensstadium, der sich entwickelnde Embryo, in diesen Tests keine Beachtung findet (*Cook et al., 1997; Grote et al., 2004; Lan & Katzenellenbogen, 1976*). Weitere nagerbasierte OECD-Tests schließen diese Lücke weitgehend, indem nicht nur die eingesetzten Elterntiere, sondern auch deren Nachkommen auf durch chemische Exposition verursachte Änderungen, unter anderem der Fortpflanzungsorgane, untersucht werden. Der pränatale Entwicklungstoxizitätstest (OECD TG 414) liefert allgemeine Informationen über die Auswirkungen einer pränatalen Exposition auf das trächtige Versuchstier und den sich entwickelnden Organismus (*OECD, 2018a*). Der Reproduktions-/Entwicklungstoxizitätstest (OECD TG 421) dient als Screening-Test der Gewinnung erster Informationen über mögliche Auswirkungen einer Prüfchemikalie auf die männliche und weibliche Fortpflanzungsfähigkeit und Entwicklung. Bei Auswertung erfolgt eine eingehende histologische Untersuchung der männlichen und weiblichen Fortpflanzungsorgane einschließlich der Eierstöcke, Hoden und Nebenhoden (*OECD, 2016*). Der kombinierte Toxizitätstest bei wiederholter Verabreichung mit Reproduktions-/Entwicklungstoxizitätstest (OECD TG 422) dient der Bestimmung der oralen Toxizität unter Verwendung wiederholter Dosen. Bei Auswertung erfolgt die Durchführung einer vollständigen Histopathologie mit besonderem Schwerpunkt auf den Stadien der Spermatogenese in den männlichen Keimdrüsen und der Histopathologie der interstitiellen Hodenzellstruktur (*OECD, 2015a*). Das Hauptziel des erweiterten Ein-Generation-Reproduktionstoxizitätstest (OECD TG 443) besteht darin, bestimmte Lebensstadien zu bewerten, die von anderen Arten von Toxizitätsstudien nicht abgedeckt werden sowie auf Wirkungen zu prüfen, die infolge einer prä- und postnatalen chemischen Exposition auftreten können (*OECD, 2018b*). Der Zwei-Generationen-Reproduktionstoxizitätstest (OECD TG 416) soll allgemeine Informationen über die Auswirkungen einer Prüfsubstanz auf die Unversehrtheit und Leistungsfähigkeit der männlichen und weiblichen Fortpflanzungsorgane, einschließlich der Gonadenfunktion, sowie die Entwicklung der Nachkommen der F1- und F2-Generation liefern (*OECD, 2001*).

Über die nagerbasierten Tests hinaus werden die kritischen Effekte von ED auf die Geschlechtsdifferenzierung in höheren Vertebraten mit Multigenerationstests an Wachteln und weiteren Vogelarten untersucht (OECD TG 206, USEPA OCSP 850.2300 und USEPA OCSP 890.2100).

Der Vogel-Reproduktionstest (OECD TG 206 und USEPA OCSP 850.2300) untersucht die Fortpflanzungseffekte von chemischen Stoffen und Stoffgemischen auf verschiedene Vogelarten. Diese Daten können für eine Risiko- und Gefährdungsbewertung von Vögeln verwendet werden, welche über Umweltexposition verschiedenen Chemikalien ausgesetzt sind. Die für das Testsystem vorgeschlagenen Vogelarten sind Stockente, Virginiawachtel und Japanische Wachtel (OECD TG 206) bzw. Stockente und Virginiawachtel (USEPA OCSP 850.2300). Die Vögel werden über einen Zeitraum von mindestens 20 Wochen mit einem Futter gefüttert, das die Prüfsubstanz enthält. Durch Manipulation der Photoperiode werden die Vögel zur Eiablage veranlasst. Die Eier werden über einen Zeitraum von etwa zehn Wochen gesammelt, markiert, gelagert und bis zum Schlupf künstlich bebrütet. Die Jungvögel werden nach dem Schlüpfen für einen Zeitraum von etwa zwei Wochen mit unbehandeltem Futter versorgt. Die betrachteten Endpunkte sind Körpergewicht und Sterblichkeit der Altvögel, Eiproduktion, Dicke der Eischale und Anzahl an zerbrochenen Eiern, Zeichen von Toxizität bei Jung- und Altvögeln sowie Schlupf- und Lebensfähigkeit der Jungvögel (OECD, 1984; USEPA, 2012a).

Der Zwei-Generationen-Toxizitätstest an der japanischen Wachtel (USEPA OCSP 890.2100) wurde als Weiterführung des Vogel-Reproduktionstests (OECD TG 206 und OCSP 850.2300) entwickelt und soll sowohl Gesundheit und Fortpflanzungsfähigkeit der F1-Generation nach der elterlichen Exposition bewerten, als auch Fitness und Physiologie der 14 Tage alten F2-Generation. Der Test dient der Charakterisierung der potenziellen schädlichen Auswirkungen einer mutmaßlich hormonaktiven Wirbeltiersubstanz auf die Vogelfauna. Die Exposition gegenüber einer Prüfsubstanz umfasst vier Lebensstadien: *in ovo*, juvenile, subadulte und adulte Tiere. Die Elterngeneration (F0) wird der Prüfchemikalie ab vier Wochen nach Schlupf ausgesetzt. Die erste Nachzucht (F1) wird der Prüfchemikalie *in ovo* (durch die Exposition der Elterntiere) und vom Schlupf bis zum Testende ausgesetzt. Die zweite Nachzucht (F2) wird vom Schlupf bis zum Testende mit unbehandeltem Futter versorgt. Die Auswirkungen der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz auf Wachstum und Entwicklung, Reproduktion, Histologie und biochemische Endpunkte der F0-, F1- und F2-Generation werden bestimmt. Zu den untersuchten Geweben gehören u.a. die Fortpflanzungsorgane inklusive Gonaden,

akzessorischen Geschlechtsorgane sowie Fortpflanzungsdrüsen und -kanäle (USEPA, 2015). Das Projekt eines Zwei-Generationen-Toxizitätstestes mit Vögeln stand bis 2013 auf dem Arbeitsplan der OECD. Trotz der Bemühungen, die Robustheit und Reproduzierbarkeit des Tests nachzuweisen, beschlossen die Länder angesichts der logistischen Komplexität, der zahlreichen möglichen Fehlerquellen des Tests und der großen Anzahl von Tieren, die für den Test verwendet werden müssen, um eine statistische Aussagekraft zu erreichen, die Entwicklung einer harmonisierten OECD-Testrichtlinie im Jahr 2014 einzustellen (OECD, 2007a, 2023a).

Die genannten nager- und vogelbasierten Testsysteme für die Ermittlung des toxischen Potentials von Chemikalien auf das Fortpflanzungssystem bergen einen hohen zeitlichen, personellen und finanziellen Aufwand sowie eine hohe Zahl an Versuchstieren, die für diese Tests benötigt werden. Darüber hinaus beinhalten diese Tierversuche eine Vielzahl von Problemen, einschließlich ethischer Bedenken, die sich als Konsequenz der Tierhaltung unter Versuchsbedingungen ergeben, wie zum Beispiel Stress oder unvermeidbares Leiden der Versuchstiere.

1.6 Tierversuchersatzmethoden

Die In-vitro-Toxikologie wird bereits seit längerem als Ausweg aus dem Versuchstier-Dilemma gehandelt. So hat es sich das *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) zur Aufgabe gemacht, die Entwicklung und Anerkennung zellbasierter Alternativmethoden für die Gefahrenabschätzung von Chemikalien für die Europäische Gemeinschaft zu fördern. Auf deutscher Ebene ist die am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ansässige *Zentrastelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch* (ZEBET) mit derselben Thematik beschäftigt. Beide Fachgruppen entwickeln Alternativmethoden entsprechend dem 3R-Prinzip. Bereits Mitte des 20ten Jahrhunderts befassten sich die Wissenschaftler *Russell & Burch (1959)* mit der Tierversuchs-Thematik und der humanen Behandlung von Versuchstieren. Ihr Prinzip der 3Rs (refine, reduce, replace), das bereits in vielen Gesetzen und technischen Richtlinien umgesetzt und angewendet wird, stellt den heute weithin akzeptierten Standard für den Einsatz von Tierversuchen dar (Manciocco et al., 2009; Vitale et al., 2009).

Heutzutage steht bereits eine Vielzahl an routinemäßigen In-vitro-Methoden für regulatorische Zwecke zur Verfügung. Durch ihre gute Vereinbarkeit mit dem 3R-Prinzip finden sie zunehmend Gebrauch in den verschiedensten wissenschaftlichen Bereichen. Derzeit werden in der In-vitro-Toxikologie vornehmlich Prüfrichtlinien angeboten, die auf humanen Zelllinien

basieren, aber auch Zelllinien von Säuger- und Nicht-Säuger-Modellorganismen kommen zum Einsatz. Diese Tests dienen der Detektion von Substanzen mit Bindeaffinität zum Estrogenrezeptor (ER) (TG 493; *OECD, 2015b*) oder Androgenrezeptor (AR) (USEPA TG OPPTS 890.1150; *USEPA, 2009*), aber auch die Detektion von Agonisten und Antagonisten des ER (OECD TG 457; *OECD, 2012b*) oder AR und sowie die Detektion von Substanzen mit dem Potential, die Steroidogenese, genauer die Produktion von 17 β -Estradiol (E₂) und Testosteron, zu beeinflussen (OECD TG 456; *OECD, 2011*) werden mit In-vitro-Tests realisiert.

Die Vorzüge von In-vitro-Verfahren sind neben der guten Automatisierbarkeit und der einfachen Handhabung auch die Realisierbarkeit der Versuchsdurchführung im Hochdurchsatz. Ein weiterer Vorteil ist, dass Untersuchungen, die auf der Wechselwirkung einer Chemikalie mit den Hormonrezeptoren oder Bindungsproteinen basieren, präzise Wirkmechanismen liefern können. Daraus ergibt sich aber zugleich ihr Nachteil, da lediglich die Wechselwirkung zwischen Rezeptor bzw. Protein und Chemikalie berücksichtigt wird, eine Bestimmung der Effekte auf die Synthese oder die Bioverfügbarkeit von Hormonen jedoch nicht möglich ist. Außerdem bilden zellbasierte In-vitro-Systeme im Gegensatz zu intakten Organismen, die aus einer Vielzahl sich differenzierender Zelltypen und Gewebe bestehen, lediglich bestimmte Zelltypen in einem definierten Entwicklungsstadium ab. Damit lässt sich zwar grundsätzlich ermitteln, ob eine Substanz endokrin disruptive Potentiale aufweist, aber nicht genauer feststellen, wie ihre Wirkung in komplexen Geweben oder ihr Einfluss auf deren Entwicklung ist. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass ED nach Definition ausdrücklich auf die Effekte „in einem intakten Organismus“ abzielen. Damit stellen In-vitro-Methoden zwar ein geeignetes Instrument für erste Untersuchungen dar, sind aber auch durch Einsatz einer Batterie von Tests (noch) nicht in der Lage, das endokrine System vollständig abzubilden. Um die Gesamtheit aller potentiellen Interaktionen von ED mit dem Hormonsystem detektieren zu können, sind In-vivo-Untersuchungen als letzter Schritt bisher unabdingbar. Um diese in der Chemikalienregistrierung unter REACH auf ein Minimum zu reduzieren, fordert die ECHA ihre Registranden auf, den Tierversuch nur als letztes Mittel zu nutzen, wenn bereits alle anderen relevanten Datenquellen wie beispielsweise Alternativmethoden oder das Teilen von Daten ausgeschöpft sind (*ECHA, 2023b*).

1.7 Entwicklung einer Tierversuchersatzmethode mit dem Hühnerembryo

Ein sehr interessanter und vielversprechender Ansatz zur Reduktion von Tierversuchen ist die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens für die Untersuchung potentieller ED in

Vogelembryonen. So ist der Vogelembryo längst ein vielgenutzter Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie und Immunologie, aber zunehmend auch in der (Öko)Toxikologie. Auf Vogelembryonen basierende In-ovo-Modelle stellen einen Mittelweg zwischen In-vitro- und In-vivo-Assays dar. Da sie jedoch immer noch einen ganzen, wenn auch nicht voll entwickelten biologischen Organismus erfordern, wirken sie sich eher auf die „verfeinern“ und „reduzieren“ der 3R aus, anstatt einen Tierversuch vollständig zu ersetzen (*Ball & Lavado, 2021*).

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich der Hühnerembryo (*G. gallus domesticus*) als geeignetes Modell für die Untersuchung von Umweltschadstoffen, inklusive ED, herausgestellt (*Berge et al., 2004; Brunstrom & Halldin, 2000; Eising et al., 2001*). Da bekannt ist, dass der Einfluss von Xenohormonen in sich entwickelnden Vogelembryonen zu irreversiblen Missbildungen der Geschlechtsorgane oder nach Schlupf zu einem gestörten geschlechtsbezogenen Verhalten führen kann, während ED weniger starke und häufig reversible Effekte in der Adultphase der Tiere auslösen (*Adkins-Regan, 1990; Ottinger & Abdelnabi, 1997*), eignet sich der Vogelembryo in besonderer Weise für die Untersuchung der frühen Geschlechtsentwicklung und der möglichen Einflüsse von ED. Im Gegensatz zu anderen aquatischen oder säugerbasierten Testsystemen stellt das Hühnerei ein bis auf den Übergang von Gasen geschlossenes System ohne jeden Austausch mit seiner Umgebung dar. Dies beinhaltet auch die vom Muttertier unabhängige Entwicklung des Embryos (*De Groef et al., 2008*), was zur Folge hat, dass der Embryo nach Eiablage weder von deren Hormonsystem beeinflusst wird, noch dass Elterntiere getötet werden müssen, um den Embryo in einer frühen, pränatalen Phase untersuchen zu können. Ein weiterer bedeutender Vorteil bei der Chemikaliertestung *in ovo* ist die Applikation von Substanzen direkt in das Ei, was spezifische und standardisierte Dosierungen ermöglicht (*Berg et al., 1999*). Weil nach der Applikation kein Austausch oder Verlust von Versuchssubstanz möglich ist, resultiert diese Technik in einer chronischen Exposition des Embryos, die ausreichend ist, um dessen Entwicklung signifikant zu beeinflussen. Vor allem der Hühnerembryo hat sich als besonders vorteilhaft für die Untersuchung von Umweltschadstoffen und ED herausgestellt, da die Eier des Haushuhns das ganze Jahr über einfach zu beziehen sind und die Inkubation in Temperatur- und Luftfeuchte-regulierten Bebrütern relativ einfach realisierbar ist. Die Untersuchung potentieller Auswirkungen von ED auf den Hühnerembryo wird zudem dadurch erleichtert, dass dessen Normalentwicklung bereits vollständig beschrieben (*Hamburger & Hamilton, 1992; Keibel & Abraham, 1900; Starck & Ricklefs, 1997*) und die einzelnen Entwicklungsstadien leicht identifizierbar und gut einsehbar sind.

1.8 Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos

Geschlechtschromosomen bei Säugern und Vögeln

Bei Wirbeltieren ist die frühe Embryonalentwicklung durch einen sexuell undifferenzierten Zustand gekennzeichnet, das sogenannte "indifferente" oder "bipotente" Stadium. In diesem Stadium sind die Gonaden beider Geschlechter morphologisch identisch und werden erst während der anschließenden Differenzierung in die ovarielle oder testikuläre Bahn gelenkt (Ayers et al., 2016; Estermann et al., 2021; Lambeth et al., 2013). Sowohl bei Säugetieren als auch bei Vögeln ist das homogametische Geschlecht das Standardgeschlecht. Säugetiere haben ein XX:XY-Geschlechtschromosomensystem, wobei das genetische Männchen heterogametisch (XY) und das genetische Weibchen homogametisch (XX) ist. Das auf dem Y-Chromosom lokalisierte SRY-Gen (engl.: *sex determining region of Y*; SRY) fungiert bei Säugetieren als Hauptgeschlechts-Determinante und steuert die Bildung der Hoden (Gubbay et al., 1990; She & Yang, 2017; Sinclair et al., 1990). Das aus den Hoden freigesetzte Testosteron bewirkt dann die Maskulinisierung des Fortpflanzungstraktes von männlichen Embryonen. In Abwesenheit von Testosteron entwickelt sich der weibliche Phänotyp. Bei Nichtsäugern, wie den Vögeln, ist das für die Maskulinisierung der Embryonen zuständige SRY-Gen jedoch nicht vorhanden. Hier spielen andere geschlechtschromosomal gebundene Gene eine entscheidende Rolle (Morris et al., 2018).

Vögel haben ein ZZ:ZW-Geschlechtschromosomensystem, wobei genetische Männchen das homogametische Geschlecht (ZZ) und genetische Weibchen das heterogametische Geschlecht (ZW) repräsentieren (Fridolfsson et al., 1998; Handley et al., 2004). Bei vielen Vogelarten, inklusive dem Huhn, sind die Geschlechtschromosomen Z und W gut unterscheidbar. Das Z-Chromosom ist mit 8 Megabasen relativ groß und Träger von etwa 1000 Genen (Bellott et al., 2010). Die meisten Z-gebundenen Gene kodieren Proteine für den allgemeinen Stoffwechsel und zelluläre Erhaltungsfunktionen, die nicht geschlechtsgebunden sind (Bellott et al., 2010; Ezaz et al., 2006). Das W-Chromosom ist ein kleineres, degradiertes Homolog des Z-Chromosoms, mit wenigen echten Genen (Ayers et al., 2013; Fridolfsson et al., 1998; Smeds et al., 2015; Xu & Zhou, 2020), die vermutlich dosisabhängig sind und durch ihre Bedeutung im Laufe der Evolution nicht verloren gingen (Ayers et al., 2013; Bellott & Page, 2021; Bellott et al., 2017).

Wie bei Säugetieren findet auch beim Huhn die Geschlechtsdifferenzierung der Gonaden während des Embryonalstadiums statt und wird durch Gene kontrolliert, welche auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert sind (Chue & Smith, 2011; Guioli et al., 2014; Smith,

2010; Smith & Sinclair, 2004). Es ist allgemein akzeptiert, dass die primäre Geschlechtsbestimmung bei Vögeln wahrscheinlich von einem Gendosierungsmechanismus abhängt, der auf einem oder mehreren Genen des Z-Chromosoms beruht (Hirst et al., 2017). Neueste Studien legen nahe, dass das in den Keimdrüsen exprimierte *Doublesex and mab-3 related transcription factor 1* (DMRT1) der wichtigste Z-gebundene genetische Auslöser für die Hodenbildung beim Huhn ist (Estermann et al., 2021; Ioannidis et al., 2021; Lee et al., 2021; Smith et al., 2009). DMRT1 funktioniert über einen Dosierungsmechanismus (Smith et al., 2009), und seine chromosomale Lage macht das Gen zu einem erstklassigen Kandidaten für die Steuerung der Geschlechtsbestimmung in den Gonaden (Estermann et al., 2021). Während der Entwicklung wird DMRT1 in beiden Geschlechtern exprimiert, durch Vorhandensein des doppelten Z-Chromosoms jedoch immer stärker im männlichen Geschlecht. Der anfängliche zweifache Unterschied in der DMRT1-Expression zwischen den Geschlechtern ist schließlich ausreichend, um die Bildung von Hoden und nicht von Eierstöcken zu fördern (Estermann et al., 2021). Auf Grundlage aktueller Studien wird davon ausgegangen, dass eine erhöhte Expression von DMRT1 in ZZ-Embryonen die *Forkhead box protein L2*- (FOXL2-) Aromatase-Achse in den Marksträngen antagonisiert, die normalerweise zur Synthese von Estrogen und zur Differenzierung der Eierstöcke führt (Ioannidis et al., 2021).

Gonadale Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos

Der Hühnerembryo ist einer der am häufigsten genutzte Modellorganismen für die Untersuchung der Embryogenese bei Wirbeltieren sowie der Geschlechtsbestimmung bei Vögeln und der Untersuchung der Geschlechtsdifferenzierung ihrer Gonaden (Chue & Smith, 2011; Guioli et al., 2014). Die Gesamtdauer der Embryogenese des Huhns beträgt 21 Tage. Zu Beginn ihrer Entwicklung weisen beide Geschlechter paarig angelegte, undifferenzierte Keimdrüsen und Müllersche Gänge (engl.: Mullerian Ducts; MD) auf, die sich mit der beginnenden Gonadogenese geschlechtsabhängig differenzieren (Romanoff, 1960). Am Entwicklungstag 2 (E2) führt die Zellproliferation im medialen lateralen Plattenmesoderm des Hühnerembryos zur Bildung der Vorläuferzellen der Gonaden (Yoshino & Saito, 2019). Die Keimdrüsen in diesem Stadium gelten als indifferent, obwohl ihr Schicksal bereits durch ihre Geschlechtschromosomen-Konstitution (ZZ oder ZW) bestimmt ist. Das embryonale Urogenitalsystem entsteht etwa am Entwicklungstag 3 (E3) aus dem intermediären Mesoderm und ist durch eine lokale Verdickung des Coelom-Epithels ventral der embryonalen Nieren (Mesonephren) gekennzeichnet (Carlson & Stahl, 1985). Bei beiden Geschlechtern überlagert diese Epithelschicht ein inneres Mark aus Zellsträngen, den sogenannten „medullären Strängen“, die mit losen Mesenchymzellen durchsetzt sind. Dies geschieht zwischen E3,5 und

E4,5. Die primordialen Keimzellen (engl.: Primordial Germ Cells; PGC), die aus der Keimsichel über den Blutkreislauf in die Gonaden eingewandert sind (Ginsburg & Eyalgiladi, 1987; Nakamura et al., 2013), besiedeln sowohl das Mark als auch das Oberflächenepithel der Gonaden. An E5 besteht die undifferenzierte Gonadenanlage beim Huhn aus einer ausgeprägten Medulla und einem säulenförmigen Epithel an der äußeren Oberfläche (Stahl & Carlon, 1973), das auch als Keimepithel bezeichnet wird. Die Differenzierung der bipotenten Keimdrüse in einen Hoden oder einen Eierstock findet etwa bei E6-6,5 der Entwicklung statt und ist histologisch ab etwa E6 sichtbar (Hamburger & Hamilton, 1992).

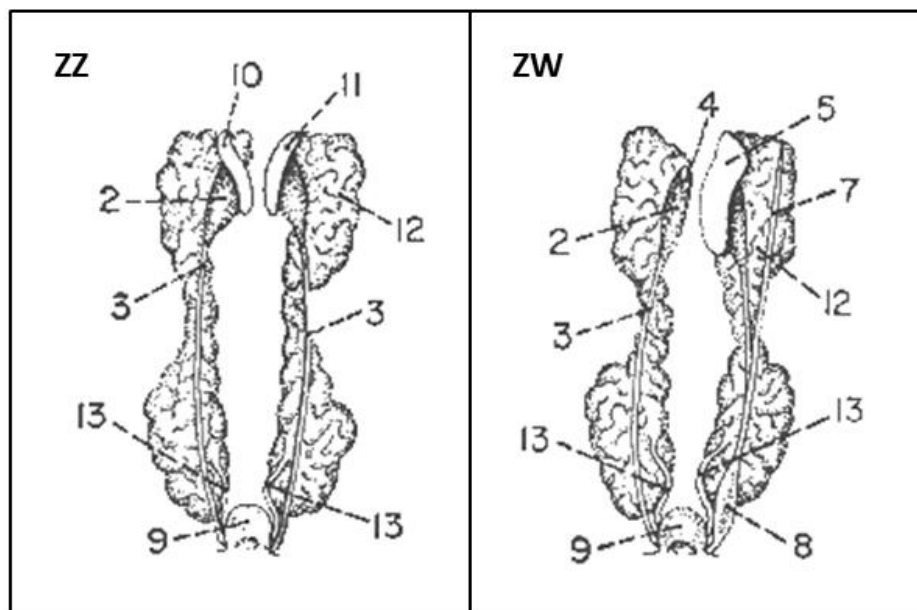


Abbildung 1: Das Urogenitalsystem männlicher (links, ZZ) und weiblicher (rechts, ZW) Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 20 der embryonalen Entwicklung. 2: Wolffsche Körper; 3: Wolffsche Gänge; 4: rechtes Ovar; 5: linkes Ovar; 7: linker Müllerscher Gang; 8: Uterus; 9: Kloake; 10: rechter Hoden; 11: linker Hoden; 12: Metanephros; 13: Ureter (Harnleiter). Genetische Männchen (ZZ) weisen paarige Hoden (10, 11) nahezu identischer Form und Größe auf, während sich das Ovar genetischer Weibchen (ZW) asymmetrisch differenziert und an einem voll differenzierten linken (5) sowie einem zurückgebildeten rechten (4) Ovar erkennbar ist. Aus Romanoff (1960) (verändert).

Bei den Männchen erfolgt die Differenzierung der Keimdrüsen durch die Vergrößerung und Vermehrung somatischer Zellen der Markstränge (Carlon & Stahl, 1985, 1973) zu sogenannten Sertoli-Zellen. Wie bei den Säugetieren stellen die Sertoli-Zellen die erste sich im Hühnerhoden differenzierende Zelllinie dar, welche die Marker DMRT1, Anti-Müller-Hormon (AMH) und den Transkriptionsfaktor SOX-9 (SOX9) exprimiert (Chue & Smith, 2011; Lambeth et al., 2014). Bei männlichen Embryonen bilden sich im Laufe der Gonadogenese beide MD zurück, während sich die Gonaden zu beidseitig funktionellen Hoden entwickeln. AMH trägt dabei zur Regression der MD, der ursprünglichen embryonalen Eileiter, bei. Die äußere Rinde des sich entwickelnden Hodens flacht zunehmend ab und verbleibt schließlich als dünne Epithelschicht.

Die PGC werden in den sich entwickelnden Samensträngen eingeschlossen und durchlaufen einen mitotischen Stillstand. Erst nach dem Schlüpfen treten sie in die Meiose ein.

Das weibliche Reproduktionssystem der Vögel ist einzigartig, da sich ihre Fortpflanzungsorgane asymmetrisch entwickeln. Obwohl sich zu Anfang paarweise Gonadenanlagen ausbilden, differenzieren sich nur das linke Ovar und der linke MD zu voll funktionierenden Organen, während sich das rechte Ovar und der rechte MD zurückbilden (*Jacob & Bakst, 2007; Romanoff, 1960*). Diese ausgeprägte Rechts-Links-Asymmetrie ist kennzeichnend für weibliche Hühnerembryonen sowie die meisten Vogelarten (*Guioli et al., 2014*). Bei den Weibchen ist die Differenzierung des linken Ovars durch eine Verdickung der äußeren Rindenschicht, dem sogenannten Cortex, gekennzeichnet, in welchem sich vermehrt PGC ansammeln (*Carlson & Stahl, 1985*). Ab E9 beginnen die PGC mit der Follikogenese, und es bilden sich Keimzellnester. Die Entwicklung des funktionalen linken Ovars ist erst nach dem Schlupf mit der Bildung von Primordialfollikeln abgeschlossen. Das rechte Ovar wächst nur wenig, bildet keinen verdickten Cortex aus, und auch die PGC treten nicht in die Meiose ein. Das rechte Ovar bildet sich zunehmend zurück und verkümmert schließlich (*Fry, 1995*). Jedoch bilden sich im inneren Mark sowohl des rechten als auch des linken Ovars im Laufe der Differenzierung charakteristische flüssigkeitsgefüllte Hohlräume, sogenannte *Lacunae*, aus (*Bernardo et al., 2015; Smith et al., 2008*), welche für die Ausscheidung toter Oogonien zuständig sind (*Romanoff, 1960; Ukeshima, 1994*).

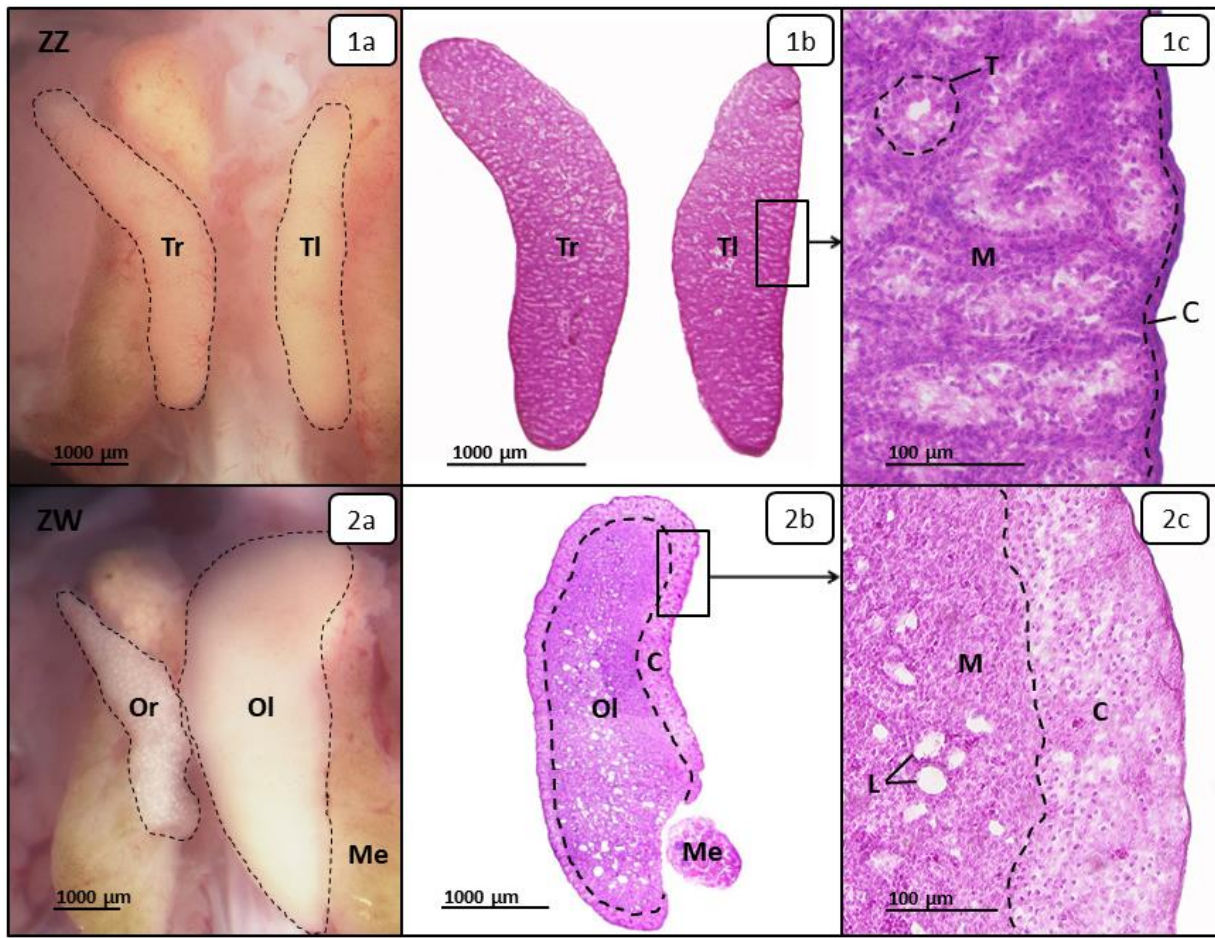


Abbildung 2: Rechter und linker Hoden (1a-c) bzw. rechtes und linkes Ovar (2a-c) unbehandelter Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung. 1a: Unfixierter rechter (Tr) und linker (TI) Hoden (schwarz umrandet) unbehandelter genetischer Männchen (ZZ). Die Hoden weisen nahezu die gleiche Größe und Form auf. 1b: Histologischer Dünnschnitt (6 µm) des rechten (Tr) und linken (TI) Hodens. Die Hoden weisen eine vergleichbare Struktur auf. 1c: Histologischer Dünnschnitt (6 µm) des linken Hodens in Nahansicht. Der Cortex (C) ist etwa zwei bis drei Zellschichten stark und umschließt die Medulla (M) in welcher Interstitialgewebe und *Tubuli seminiferi* (T) vorliegen. 2a: Unfixiertes rechtes (Or) und linkes (Ol) Ovar (schwarz umrandet) unbehandelter genetischer Weibchen (ZW). Das linke Ovar ist voll differenziert, während das rechte Ovar zurückgebildet und deutlich kleiner ist. 2b: Histologischer Dünnschnitt (6 µm) des linken Ovars (Ol) mit gut differenziertem ovariellen Cortex (C), welcher das Ovar beinahe vollständig umgibt (ausschließlich der Region nahe dem Mesonephron (Me)). 2c: Histologischer Dünnschnitt (6 µm) des linken Ovars in Nahansicht. Die gut differenzierte Cortexregion umschließt eine lose angeordnete Medulla (M), welche von *Lacunae* (L) durchzogen ist. Die histologischen Dünnschnitte wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Aus Jessl et al. (2018b) (verändert).

Rolle von Hormonen bei der gonadalen Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos

Obwohl Testosteron bei Säugetieren eine maskulinisierende Wirkung hat, gibt es bei Vögeln bisher keinen Hinweis darauf, dass Androgene eine vergleichbare Rolle bei der Morphogenese der Hoden spielen (Estermann et al., 2021; Groenendijk-Huijbers & Van Schaik, 1976). Tatsächlich ist bei Vögeln die An- bzw. Abwesenheit von Estrogen in der frühen Embryonalentwicklung sowohl in den Gonaden als auch im Gewebe ausschlaggebend für deren Entwicklung (Brunstrom et al., 2009; Gurney & Konishi, 1980; Scheib, 1983; Vaillant et al., 2001b). An E6 beginnt bei weiblichen Hühnerembryonen die W-Chromosomal kontrollierte

Expression des Schlüsselenzyms Aromatase (auch P450-Aromatase), wobei Androgen das Substrat für die Aromatisierung und Estrogenproduktion liefert (Ayers *et al.*, 2013; Estermann *et al.*, 2021; Kagami & Hanada, 1997; Scheider *et al.*, 2014; Shimada, 1998, 2002; Yoshida *et al.*, 1996). Die Aktivität von Aromatase ist in Wachtel- und Hühnerembryonen in weiblichen Gonaden nachweislich höher als in männlichen Gonaden (Scheib *et al.*, 1985; Vaillant *et al.*, 2001b; Villalpando *et al.*, 2000). Da Aromatase nur in geringem Maße in den Gonaden genetischer Männchen exprimiert wird (Ayers *et al.*, 2013; Mattsson *et al.*, 2008; Scheider *et al.*, 2014), ist die geschlechtsbedingte Estrogen-Konzentration in den Hoden sehr niedrig (Tanabe *et al.*, 1979, 1983; Woods & Erton, 1978) und nicht ausreichend, um auf natürlichem Weg eine Feminisierung herbeizuführen. Die Estrogenproduktion ist in der Medulla der weiblichen Gonaden lokalisiert und für die ordnungsgemäße Bildung der Ovarien unerlässlich (Ayers *et al.*, 2013; Elbrecht & Smith, 1992; Lambeth *et al.*, 2013; Scheib, 1983; Vaillant *et al.*, 2001b). Weibliche Vogelembryonen weisen daher bereits in der Embryonalentwicklung ein deutlich höheres Plasmalevel an E₂ auf als männliche Embryonen (Ottinger *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 1988; Woods & Brazzill, 1981). Der Unterschied zwischen der Entwicklung des rechten und linken weiblichen Ovars basiert auf der asymmetrischen Expression des ER α . Beim Wachtel- und Hühnerembryo sind bereits zu Beginn der morphologischen Gonadendifferenzierung sowohl Aromatase als auch ER α im linken Ovar deutlich stärker vorhanden als im rechten Ovar (Andrews *et al.*, 1997; Mattsson *et al.*, 2008; Nakabayashi *et al.*, 1998; Sakimura *et al.*, 2002; Villalpando *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 1996). So wurden in beiden Geschlechtern Estrogen-Bindestellen und ER α -Protein im Keimepithel der linken Gonade und in der Medulla beider Gonaden lokalisiert (Gasc, 1980; Guioli & Lovell-Badge, 2007; Ishimaru *et al.*, 2008). Das vom weiblichen Embryo synthetisierte Estrogen stimuliert dann die Proliferation der Eierstockrinde über die Aktivierung von ER α (Mattsson *et al.*, 2008). Die im Ovar synthetisierten Estrogene sollen den linken MD vor der ER-vermittelten Rückbildung schützen (Ha *et al.*, 2004; MacLaughlin *et al.*, 1983). Da im linken MD von weiblichen Hühnerembryonen eine höhere Expression von ER α -messenger RNA (mRNA) gefunden wurde als im rechten, wird vermutet, dass ER α die schützende Wirkung von Estrogen vermittelt (Ha *et al.*, 2004). Die relative Abwesenheit des ER α im rechten Ovar erlaubt keine E₂-Aktivität, sodass AMH die corticale Entwicklung inhibiert, die schließlich zur Regression des rechten Ovars und MD führt (Bruggeman *et al.*, 2002). Mit der Herabregulierung von ER α in der rechten Gonade ist zu erklären, dass die Bildung eines normalen Ovarialcortex ausbleibt. Die Asymmetrie der Ovarialentwicklung im Hühnermodell kann daher auf Links-Rechts-Unterschiede in der Estrogenwirkung zurückgeführt werden (Smith & Sinclair, 2004).

1.9 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes „GenOvotox II – Entwicklung und Evaluierung eines sensitiven und kostengünstigen Tierersatzsystems für die Abschätzung des Hormon-toxischen Potentials von Chemikalien als Disruptoren der embryonalen Gonadenentwicklung“ durchgeführt. Das Ziel dieses Projektes war die Entwicklung einer auf Hühnerembryonen basierenden Alternativmethode zu den bisher eingesetzten Nagerassays für die Untersuchung der Effekte hormonell aktiver Substanzen auf die Geschlechtsdifferenzierung in höheren Wirbeltieren. In dem vom Hessischen Kultusministerium im Rahmen der Hessischen Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) geförderten Vorgängerprojekt GenOvotox I wurden durch diverse Vorarbeiten bereits die toxikologischen Grundlagen für die Entwicklung des angestrebten Testsystems und damit auch der vorliegenden Dissertation geschaffen. So wurden nach sorgfältiger Literaturrecherche sowohl potentielle ED als auch mögliche gonadenbezogene Endpunkte für endokrine Effekte bestimmt. Die ausgewählten estrogenen und androgenen Verdachtssubstanzen hatten bereits eine Anzahl hormoneller Störungen in anderen Organismengruppen hervorgerufen, sodass davon auszugehen war, dass diese auch im Hühnerembryo hormonell disruptive Effekte hervorrufen würden. In den folgenden Versuchen wurde eine umfassende morphologische, histologische sowie genetische Beschreibung unbeeinflusster, lösemittelbehandelter und substanzbehandelter Gonaden von E19-Embryonen des Haushuhns vorgenommen. Daraus resultierten schließlich statistisch abgesicherte, morphologisch-histologische Daten zur Wirkung der untersuchten Substanzen auf die linken und rechten Gonaden von E19-Embryonen. Durch Genexpressionsanalysen und die Erstellung hochauflösender Transkriptionsprofile war außerdem der Nachweis substanzspezifischer Reaktionen auf Ebene der Transkripte möglich und erlaubte die Identifizierung diverser differentiell exprimierter Gene, die potentiell auf hormonell aktive Substanzen reagieren. Eine detaillierte Beschreibung dieser Vorarbeiten findet sich in den Veröffentlichungen von *Scheider et al. (2014, 2018)* und ist Bestandteil der Dissertation von Dr. Jessica Scheider (*Scheider, 2019*).

Grundlagenuntersuchungen

Die Charakterisierung der Normalentwicklung des Testorganismus, unbeeinflusst von ED, stellte einen ersten, grundlegenden Schritt für die erfolgreiche Testentwicklung dar. Für die Grundlagenuntersuchung von unbehandelten und lösemittelbehandelten Kontrollgruppen wurden in einer Vielzahl von Versuchen über einen Zeitraum von drei Jahren diverse

Endpunkte von unbehandelten sowie lösemittelbehandelten Kontrollen ausgewertet. Die im Rahmen der Veröffentlichung ermittelten Messwerte können als Leitwerte bzw. Validitätskriterien für weitere Versuche dienen und für den Vergleich zwischen Kontrollen und substanzbehandelten Gruppen herangezogen werden. Eine weiterführende Beschreibung findet sich in der zugehörigen Veröffentlichung von *Jessl et al. (2018a)* und der Dissertation von Dr. Jessica Scheider (*Scheider, 2019*). Die Vorarbeiten zur embryonalen Normalentwicklung werden in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen sowie inhaltlich fortgesetzt, um die Effekte nachfolgender Substanzversuche in ein Verhältnis zur natürlichen Entwicklung des Hühnerembryos setzen zu können.

Untersuchungen zu Endokrinen Disruptoren

Der Fokus der vorliegenden Dissertation liegt auf der Untersuchung der morphologisch-histologischen Veränderung der Gonaden von substanzbehandelten E19-Embryonen aus GenOvotox I und II. Dabei wurde der Fragestellung nachgegangen, welchen Einfluss die verschiedenen Substanzen auf die Differenzierung der beiden Geschlechter haben, ob die Embryonen von *G. gallus domesticus* bezüglich der gewählten gonadenbezogenen Endpunkte ausreichend sensibel auf die getesteten Verbindungen reagieren und damit den Nachweis von ED generell ermöglichen und wie tief die Untersuchung der Gonaden gehen muss, um belastbare Ergebnisse zu erzielen. Es wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Die untersuchten morphometrischen Endpunkte eignen sich für den Nachweis toxischer Effekte ausgewählter endokriner Disruptoren auf die Embryonalentwicklung von *Gallus gallus domesticus*.
2. Die In-ovo-Exposition von *Gallus gallus domesticus* gegenüber ausgewählten (anti)estrogenen und (anti)androgenen Verbindungen führt zu teratogenen Effekten auf die Gonaden von E19-Embryonen.
3. Die untersuchten gonadenbezogenen Endpunkte eignen sich für den Nachweis der Effekte ausgewählter endokriner Disruptoren auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos von *Gallus gallus domesticus*.
4. Histologische Untersuchungen der Gonaden lassen sich durch anatomische Marker ersetzen.
5. Der Embryo von *Gallus gallus domesticus* eignet sich als alternatives Versuchssystem zur Untersuchung und zum Nachweis der Effekte ausgewählter endokriner Disruptoren.

Dazu wurden neben der Durchführung und Auswertung eigener Laborversuche mit ausgewählten (anti)estrogenen und (anti)androgenen Versuchssubstanzen auch bereits vorliegende Daten zu estrogenen und androgenen Versuchssubstanzen aus dem Vorgängerprojekt GenOvotox I miteinbezogen. Folgende Verbindungen wurden dabei mit dem Testsystem Hühnerembryo untersucht:

- ✓ Estrogene: BPA, EE₂
- ✓ Androgene: MT, TBT, Trenbolon
- ✓ Antiestrogene: Fulvestrant, Tamoxifen, Tributylphosphat (TBP), Terbutryn
- ✓ Antiandrogene: CPA, *p,p'*-DDE, Flutamid

Folgenden Endpunkte wurden berücksichtigt:

- ✓ Mortalität
- ✓ Missbildungsrate
- ✓ Körperlänge von Ulna (Elle), Tarsometatarsus (Laufbein) und Cranium (Schädel)
- ✓ linke und rechte Gonadenflächen von Männchen und Weibchen
- ✓ Cortexdicke der linken Gonade von Männchen und Weibchen
- ✓ der Prozentsatz an *Tubuli seminiferi* (Samenkanälchen) im linken Hoden.

2 DISKUSSION

Der Fokus der vorliegenden Dissertation, die im Rahmen des BMBF-geförderten Projekts „GenOvotox II“ durchgeführt wurde, liegt auf der Anwendbarkeit einzelner morphologischer und histologischer Endpunkte sowie des Testsystems Hühnerembryo im Ganzen zur Identifizierung von ED als Tierversuchersatzmethode. Betrachtet werden 12 potentiell wirksame (anti)estrogene und (anti)androgene ED und deren Wirkung auf die allgemeine Entwicklung sowie die gonadale Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos. Zwar sind alle getesteten Substanzen als ED bei Säugern bekannt, jedoch kann aufgrund der Befunde der Untersuchungen im Hühnereitest nicht auf einen spezifischen Wirkmechanismus bei *G. gallus domesticus* geschlossen werden, da mit diesem Test lediglich apikale Endpunkte untersucht werden.

Da der sich entwickelnde Hühnerembryo besonders anfällig für Umweltschadstoffe, inklusive ED, ist, kann die Behandlung von Embryonen mögliche Effekte von Substanzen offenlegen, die im adulten Individuum nicht detektierbar sind. Obwohl der Vogelembryo bereits seit Jahrzehnten ein vielgenutzter Modellorganismus in der (Öko)Toxikologie und anderen Wissenschaften ist, steht bisher kein OECD-Test mit dem Vogelembryo zur Verfügung. Als Alternative zu bisher anerkannten Assays könnte der Hühnereitest dazu beitragen, künftig weniger Versuchstiere für toxikologische Untersuchungen zu konsumieren.

Im Folgenden werden die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erhobenen Ergebnisse zusammengefasst und diskutiert. Eine detaillierte Erläuterung zu den durchgeführten Untersuchungen finden sich in den Publikationen im Anhang (A.1-A.4).

2.1 Normalentwicklung des Hühnerembryos

In einer Grundlagenuntersuchung wurde die Normalentwicklung des Hühnerembryos untersucht. Diese sollte dazu dienen, die Variabilität individueller Parameter in unbehandelten und lösemittelbehandelten Kontrollgruppen systematisch zu untersuchen und die natürliche Varianz des Systems zu bestimmen. Darüber hinaus wird ein Vergleich zwischen unbehandelter und lösemittelbehandelter Gruppe gezogen, um einen möglichen Einfluss zu ermitteln. Die in den Grundlagenuntersuchungen bestimmten arithmetischen Mittelwerte aller Endpunkte können als Schlüsselwerte für weitere Versuche unter ED-Einfluss dienen. Die Erkenntnisse der Grundlagenuntersuchungen am Hühnerembryo werden an dieser Stelle lediglich angeschnitten und dienen dazu, eine Aussage über die Eignung der dargestellten Endpunkte in

Zusammenhang mit ED für den Hühnereitest zu treffen. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in der zugehörigen Veröffentlichung von *Jessl et al. (2018a)*.

2.1.1 Morphometrische Endpunkte

Als Begleitparameter sollten verschiedene Endpunkte in jedem Experiment mitgeführt werden. Diese sollten nach Möglichkeit einfach bestimmbar und aussagekräftig sein. Grundsätzlich sind Endpunkte von Vorteil, die mit einer ausreichend großen Menge bereits vorliegender Daten verglichen werden können.

Mortalität

Der Endpunkt *Mortalität* gibt Hinweise auf die Toxizität einer Substanz, d.h. der Fähigkeit, ungewollte Wirkungen zu entfalten oder Funktionen zu beeinträchtigen, bis hin zum Tod des untersuchten Organismus. Die Toxizität hängt dabei nicht nur von der Substanz selbst, sondern unter anderem auch von der eingesetzten Dosis, dem Expositionszeitpunkt und der Dauer der Exposition ab.

In einer Reihe von Versuchen wurde die Mortalität der Embryonen unbehandelter und lösemittelbehandelter Gruppen untersucht und miteinander verglichen. Dabei erreichten in über der Hälfte der Versuche alle Embryonen der unbehandelten Kontrolle erfolgreich E19. Insgesamt wiesen Embryonen der unbehandelten Kontrolle eine Mortalität von maximal 16% auf. Basierend auf den Studien von *Romanoff & Romanoff (1972)* liegt die zu erwartende Mortalität unbehandelter Hühnerembryonen bei etwa 20%. Diese vergleichsweise niedrigen Mortalitätsraten konnten auch von anderen Autoren bestätigt werden (*DeWitt et al., 2005a, 2005b; Wyatt & Howarth, 1976*). Die Behandlung mit dem Lösemittel Dimethylsulfoxid (DMSO) führt, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, zu einem signifikanten Anstieg der Mortalität. Hier kam es in einer Mehrzahl der Versuche zu einer Sterblichkeit von bis zu 25%. Nur in zwei der betrachteten Versuche lag die Mortalität höher, bei maximal 54%. Es ist bekannt, dass DMSO eine geringe intrinsische Toxizität im Huhn (*Carew & Foss, 1972; Caujolle et al., 1967; Landauer & Salam, 1972; Morgan, 1974; Wyatt & Howarth, 1976*) und verschiedenen anderen Organismen aufweist (*Anderson et al., 2004; Chen et al., 2011; Galvao et al., 2014; Stevens et al., 2015*). Die Embryomortalität der DMSO-behandelten Kontrolle lässt sich somit sehr wahrscheinlich auf die geringe intrinsische Toxizität des Lösemittels zurückführen.

Missbildungen

Der Endpunkt *Missbildungen* gibt zusätzlich Hinweise zur Teratogenität einer Substanz, d.h. der Fähigkeit, irreversible Fehlbildungen inklusive Wachstumsverzögerungen oder den Tod während der Embryonalphase eines Organismus auszulösen.

Die Missbildungen wurden an den während der Inkubationsperiode verstorbenen oder an E19 sektionierten Embryonen ermittelt. Die gefundenen Missbildungen konnten dabei entweder einzeln oder auch gemeinsam auftreten. Über die 15 betrachteten Versuchsreihen hinweg wiesen etwas mehr als 1% der unbehandelten Embryonen Missbildungen auf. Bei diesen handelte es sich vor allem um Zelosomie (Fehlbildung des Brustbeins mit hernialer Vorwölbung der Eingeweide) oder betrafen die Gliedmaßen (Fehlbildung der Flügel). In der DMSO-behandelten Gruppe traten bei knapp 6% der Embryonen Missbildungen auf. Die gefundenen Missbildungen betrafen vor allem die Augen (rechts- oder linksseitige Anophthalmie = Fehlen der Augenanlage), oft zusammen mit Fehlbildung des Schnabels (Verdrehung des gesamten Schnabels oder Atrophie des Oberschnabels), aber auch Zelosomie und weniger häufig Missbildungen der Gliedmaßen (Fehlbildung der Beine oder Füße), Ödeme und Exenzephalie (Lokalisation des Gehirns außerhalb des Schädels). Die Zahl missgebildeter Embryonen bzw. die Gesamtzahl der Missbildungen unterschied sich signifikant zwischen unbehandelter und DMSO-behandelter Kontrolle. Alle Werte der vorliegenden Arbeit liegen im Bereich der gemeldeten spontanen Fehlbildungsrate bei Hühnerembryonen von etwa 2% bis 6% (*Alsop, 1919; Byerly, 1930; Caujolle et al., 1967*). *Byerly (1930)* fand verschiedene Arten von Missbildungen bei unmanipulierten Eiern der Rasse White Leghorn, z.B. Terata der Augen (Mono-/Mikrophthalmie) oder des Gehirns (Exenzephalie, Hyperenzephalie). Die Studie von *Caujolle et al. (1967)* zeigt, dass die Art spontaner Fehlbildungen bei Hühnerembryonen ein häufiges Muster aufweist: Anophthalmie, gekreuzter Schnabel mit oder ohne Anenzephalie und Zelosomie. Die typischsten DMSO-induzierten Missbildungen waren dagegen entweder linksseitige Anophthalmie und linksseitige Torsion des Schnabels mit Atrophie des Oberschnabels und in geringem Ausmaß auch Fehlbildungen der Gliedmaßen (Behandlung der Embryonen an E3) oder ganz allgemein Läsionen der Gliedmaßen und in geringem Maße Fehlbildungen des Schnabels und der Augen sowie Zelosomie (Behandlung der Embryonen an E4). Zusammengefasst bieten die Daten der vorliegenden Dissertation sowie der verfügbaren Literatur einen Überblick über die häufigsten natürlich auftretenden und DMSO-induzierten Missbildungen beim Hühnerembryo.

Körperlängen

Der Endpunkt *Körperlänge* kann in diesem Zusammenhang weitere Anhaltspunkte darauf geben, ob eine Substanz Wachstumsverzögerungen, wie den Minderwuchs einzelner Körperteile oder sogar des gesamten Organismus, auszulösen vermag.

Zur Ermittlung des Normalwachstums von E19-Embryonen wurde über insgesamt 20 Versuche hinweg die Länge von Cranium (Schädel), Elle (Ulna) und Laufbein (Tarsometatarsus) untersucht (unveröffentlichte Ergebnisse). Zwischen den Versuchen innerhalb der jeweiligen Kontrollgruppen und Endpunkte kommt es erwartungsgemäß zu einer Schwankung der Messwerte um einen Mittelwert. Dabei ist ein Zusammenhang zwischen den drei untersuchten Körperlängen zu erkennen, da diese von Versuch zu Versuch in etwa gleichem Maße schwanken und beispielsweise ein längerer Schädel in der Regel auch ein längeres Laufbein und eine längere Ulna bedeutet und umgekehrt.

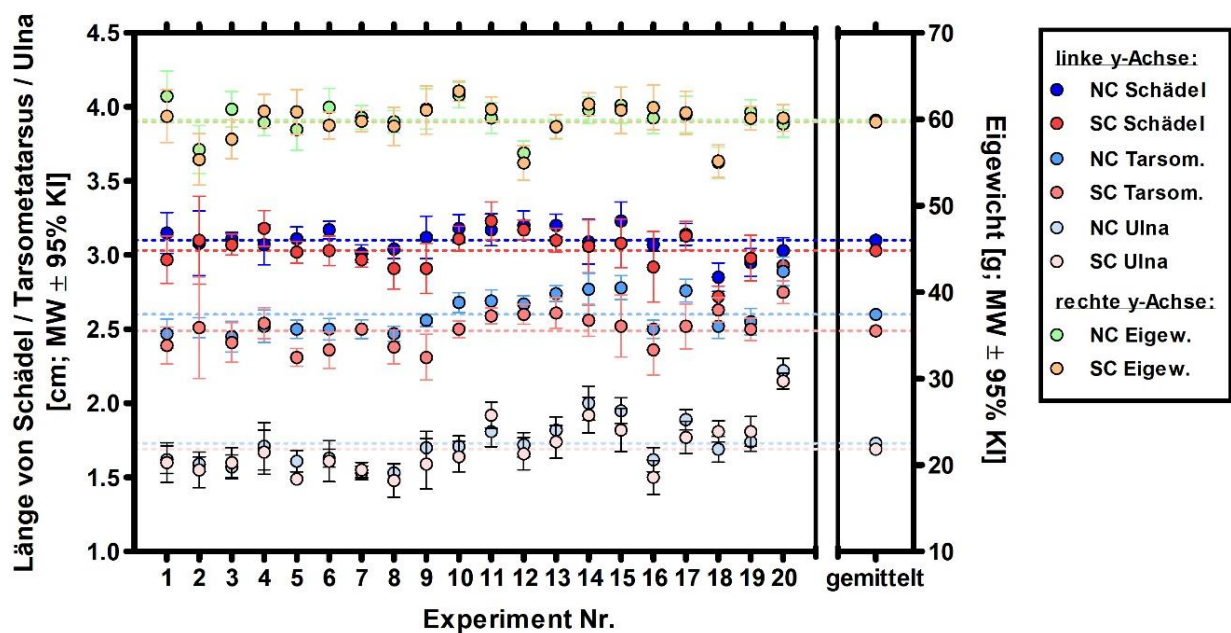


Abbildung 3: Eigewicht sowie Länge von Schädel, Laufbein (Tarsometatarsus) und Elle (Ulna) unbehandelter Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert \pm 95% Konfidenzintervall (95% KI) der Negativkontrolle (NC, $n_{\text{gesamt}}=346$) und der Lösemittelkontrolle (SC; $n_{\text{gesamt}}=272$) in jedem einzelnen Experiment dar. Die gestrichelten Linien und die unter „gemittelt“ abgebildeten Datenpunkte stellen das arithmetische Mittel aller Werte von NC und SC der 20 betrachteten Experimente dar. Unveröffentlichte Daten.

Für die drei Endpunkte Schädel, Laufbein und Elle weisen die Embryonen der unbehandelten Kontrollgruppe im Mittel etwas größere Werte als die Embryonen der Lösemittelkontrolle auf. Analog zur Mortalität kann dieser Effekt auf das Lösemittel an sich und/oder die Behandlungsprozedur, nämlich das Bohren eines Lochs in die Eischale und Einführen einer Spritze in den Eidotter, zurückgeführt werden.

2.1.2 Gonadale Geschlechtsdifferenzierung

Die Keimdrüsen männlicher und weiblicher Hühnerembryonen befinden sich an der ventromedialen Oberfläche der Mesonephren, die dorsale Aorta verläuft dazwischen. Das phänotypische Geschlecht von Vögeln kann sehr einfach durch ein Screening der Geschlechtsorgane bestimmt werden. Zusammen mit der Information über das genetische Geschlecht kann ein Einfluss von ED auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung aufgedeckt werden.

Männchen

An E19 liegen die Keimdrüsen männlicher Embryonen paarig vor. Linker und rechter Hoden sind nahezu identisch aufgebaut, spiegelverkehrt geformt und etwa gleich groß, wobei der rechte Hoden in beiden Kontrollgruppen etwa 90% der Fläche des linken Hodens erreicht. Beide Hoden sind voll ausdifferenziert und charakterisieren sich durch einen dünnen, etwa zwei bis drei Zellschichten dicken Cortex, welcher die Medulla vollständig umschließt. Die Medulla enthält die *Tubuli seminiferi*, die den Ort der Spermatogenese in postnatalen Entwicklungsstadien darstellen (Estermann et al., 2021). Im direkten Vergleich beider Kontrollgruppen fallen die rechte und linke Gonadenfläche lösemittelbehandelter Embryonen etwas kleiner aus als die unbehandelten Embryonen. Für den rechten Hoden ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Histologisch unterscheiden sich die Kontrollgruppen kaum voneinander, die lösemittelbehandelten Embryonen tendieren lediglich zu einem marginal, nicht signifikant verdickten Cortex. Auch der prozentuale Anteil der *Tubuli seminiferi* wurde durch das Lösemittel nicht beeinflusst.

Weibchen

An E19 ist der Größenunterschied zwischen linkem und rechtem Ovar deutlich erkennbar. Das linke Ovar ist bedeutend größer und stärker differenziert als das rechte, welches in beiden Kontrollgruppen im Durchschnitt etwa 20% der Fläche des linken Ovars erreicht. Das linke Ovar weist eine dicke Cortexschicht auf, welche eine gut differenzierte, locker angeordnete und von *Lacunae* durchzogene Medulla umschließt. Das zurückentwickelte rechte Ovar verfügt lediglich über ein von einem dünnem, abgeflachten Cortex umgebenes Medullagewebe, vergleichbar mit dem wenige Zellschichten dicken Cortex männlicher Embryonen. Im direkten Vergleich beider Kontrollgruppen fallen rechte und linke Gonadenfläche lösemittelbehandelter Embryonen signifikant kleiner aus, als die Gonadenflächen unbehandelten Embryonen. Histologisch unterscheiden sich beide Kontrollgruppen kaum voneinander, die lösemittelbehandelten Embryonen tendieren lediglich zu einer marginal erhöhten Cortexdicke.

Der Größenunterschied der rechten und linken Gonadenfläche zwischen unbehandelter und lösemittelbehandelter Kontrollgruppe kann auf eine wachstumshemmende, durch die geringe Basistoxizität des Lösemittels verursachte Wirkung zurückzuführen sein. Eine alternative Erklärung ist eine mögliche endokrin vermittelte Wirkung des Lösemittels. Dafür spricht, dass die Wirkung vermutlich geschlechtsspezifisch ist, da der Effekt bei weiblichen Embryonen stärker ausgeprägt ist als bei männlichen Embryonen. Die Hypothese eines lösemittelbedingten Einflusses auf das endokrine System von Organismen wird durch verschiedene Studien gestützt. So beschreiben *Hutchinson et al. (2006)* in ihrem Review über verschiedene, von der OECD vorgeschlagene Trägersubstanzen einen Einfluss von DMSO auf die Fortpflanzung verschiedener Fischarten und eine Auswirkung auf Biomarker für ED. Während DMSO in einer weiteren Studie an der Elritze keinen Einfluss auf fortpflanzungsbezogene Endpunkte, wie die Eiablage und die Reaktion von Biomarkern hat, wird eine deutliche Reduktion der durchschnittlichen Eiproduktion festgestellt (*Pawlowski et al., 2004a, 2004b*). Weitere Studien zeigen eine DMSO-bedingte Hemmung verschiedener Cytochrom-P450-Enzyme (*Busby et al., 1999; Chauret et al., 1998; Easterbrook et al., 2001; Hickman et al., 1998*). Da diese Enzyme am Stoffwechsel körpereigener Substanzen wie zum Beispiel der Steroidhormone beteiligt sind, kann die Wechselwirkung mit Lösemitteln zu einer Veränderung der zirkulierenden Hormonkonzentration mit nachfolgenden Auswirkungen auf die Fortpflanzungsfunktion führen. Eine vergleichbare Wirkung von DMSO auf die in den vorliegenden Versuchen eingesetzten Hühnerembryonen kann nicht ausgeschlossen werden.

2.2 Entwicklung des Hühnerembryos unter Einfluss von ED

Aufbauend auf den Grundlagenuntersuchungen in den Kontrollgruppen, wird im Folgenden der Einfluss verschiedener ED auf die allgemeine Entwicklung sowie die gonadale Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos beschrieben. Für die morphometrischen Endpunkte Mortalität, Missbildungsrate und Körperlänge werden die erzielten Ergebnisse jeweils substanzübergreifend diskutiert. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der Effekte endokrin disruptiver Substanzen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos liegt, werden die verschiedenen Substanzklassen getrennt nach Estrogenen, Antiestrogenen, Androgenen und Antiandrogenen betrachtet und ihre Wirkung auf die gonadenbezogenen Endpunkte Gonadenfläche, Cortexdicke und Anteil an *Tubuli seminiferi* detailliert dargelegt.

2.2.1 Wirkung von ED auf morphometrische Endpunkte

Mortalität

Bei In-ovo-Administration kam es, verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe, zu einem substanzübergreifenden Anstieg der Embryomortalität. Bei Verabreichung verschiedener Dosen einer Substanz zeigte sich ein Zusammenhang zwischen steigender Dosis und steigender Mortalität. Die simultane Verabreichung zweier antagonisierender Substanzen, zum Beispiel Tamoxifen und EE₂, führte im Vergleich zur jeweiligen Einzelsubstanz zu keiner zusätzlichen Steigerung der Mortalität. Da bezüglich der zu erwartenden substanzbedingten Mortalität zumeist keine Referenzwerte für Hühnerembryonen vorlagen, musste auf andere Vergleichsdaten zurückgegriffen oder die Mortalität in Rangefinder-Versuchen bestimmt werden. So kam es bei verschiedenen Substanzen, namentlich TBP, CPA und Flutamid, in den jeweils höchsten eingesetzten Dosen zu vergleichsweise hohen Mortalitätsraten $\geq 70\%$.

Missbildungen

Die gefundenen Missbildungen traten entweder einzeln oder auch gemeinsam auf. Betrachtet wurden alle im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Versuche, welche entweder die Einzelsubstanzen MT, Trenbolon, EE₂, BPA, Fulvestrant, Tamoxifen, Terbutryn, TBP, CPA, *p,p'*-DDE und Flutamid oder Kombinationsversuche mit Fulvestrant + EE₂, Tamoxifen + EE₂, Flutamid + MT und Flutamid + Trenbolon umfassten. Insgesamt wurden in allen Substanzversuchen embryonale Missbildungen festgestellt. Dabei wiesen zwischen 3% und 15% der substanzbehandelten Embryonen Missbildungen auf, im Mittel lag die Missbildungsrate über alle Substanzen hinweg bei etwas mehr als 6%. Die häufigsten Missbildungen der ED-behandelten Gruppen waren Fehlbildungen der Augen und des Schnabels sowie Zelosomia, gefolgt von Exencephalus, Missbildungen der inneren Organe oder der Gliedmaßen sowie Ödeme oder sonstige Fehlbildungen. Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Einsatz bestimmter Substanzen oder Substanz-Dosen und einer Steigerung der Missbildungsrate gegenüber der Kontrollgruppe (Lösemittelkontrolle) konnte nicht festgestellt werden. Weder die Gesamtzahl an missgebildeten Embryonen noch die Aufschlüsselung nach bestimmten Missbildungen zeigte eine Zunahme der Missbildungsrate bei Substanzbehandlung. Verglichen mit den in der Literatur beschriebenen spontanen oder DMSO-induzierten Fehlbildungen beim Hühnerembryo, wie Missbildungen der Augen, des Schnabels, des Gehirns, der Gliedmaßen sowie Zelosomie (Byerly, 1930; Caujolle et al., 1967), kann keine Auffälligkeit im Muster der aufgetretenen Fehlbildungen bei Substanzbehandlung festgestellt werden.

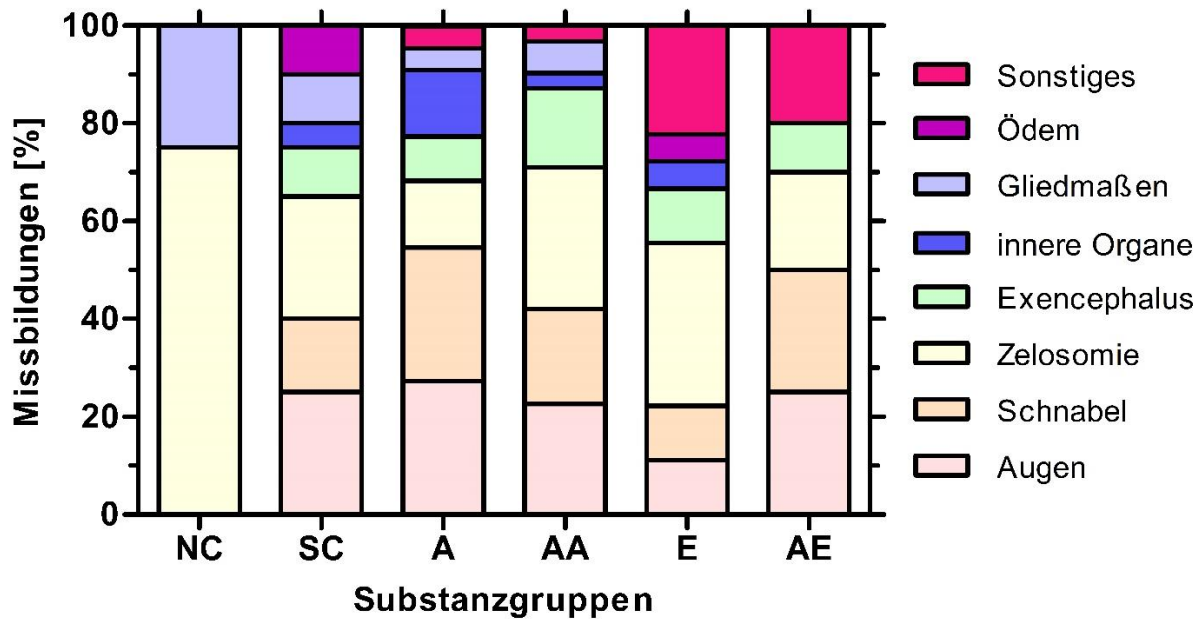


Abbildung 4: Missbildungen bei Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) bis Tag 19 der embryonalen Entwicklung. Die Balken stellen die prozentuale Verteilung der gefundenen Missbildungen der unbehandelten Negativkontrolle (NC, n=300), der Lösemittelkontrolle (SC, n=263) und der substanzbehandelten Gruppen der Androgene (A; beinhaltet MT (n=47) und Trenbolon (n=76)), der Antiandrogene (AA; beinhaltet CPA (n=70), *p,p'*-DDE (n=60) und Flutamid (n=134)), der Estrogene (E; beinhaltet BPA (n=200) und EE₂ (n=131)) und der Antiestrogene (AE; beinhaltet Fulvestrant (n=60), Tamoxifen (n=156), TBP (n=68) und Terbutryn (n=24)) dar. Unveröffentlichte Daten.

Körperlängen

Über alle betrachteten Substanzversuche hinweg waren die meisten Substanzen, verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe (Lösemittelkontrolle), unauffällig bezüglich der embryonalen Entwicklung, im speziellen des Wachstums von Schädel, Ulna und Tarsometatarsus der Embryonen. Die Körperlängen der ED-behandelten Embryonen waren dabei jeweils vergleichbar mit denen der Kontrolle. Einzige Ausnahme bildet der Versuch mit dem Antiandrogen CPA. Im Gegensatz zu anderen untersuchten Substanzen zeigt sich eine deutliche Entwicklungsstörung bei Exposition der Embryonen gegenüber CPA. Die CPA-Behandlung resultierte in einer erhöhten Inzidenz signifikanter Entwicklungsverzögerungen, welche sich insbesondere bei höheren CPA-Konzentrationen in einem Minderwuchs manifestierte. Verschiedene Körpermaße (Länge des Schädels (von der Schnabelspitze bis zum Hinterkopf), Länge der (rechten) Elle und Länge des (rechten) Tarsometatarsus) wurden als Parameter für eine statistische Auswertung herangezogen. Embryonen, die der niedrigsten CPA-Konzentration (0,2 µg/g Ei) ausgesetzt waren, zeigten im Vergleich zur lösungsmittelbehandelten Kontrollgruppe keine Veränderungen der Körpermaße, während höhere CPA-Konzentrationen (2 und 20 µg/g Ei) zu einer statistisch signifikanten Verringerung aller Parameter führten. Eine Reihe von Experimenten an Säugetieren deutet darauf hin, dass

antiandrogene Substanzen die Reifung und das Längenwachstum der Knochen beeinflussen können. Antiandrogene wirken in allen Androgen-Zielorganen und beeinflussen prinzipiell alle Funktionen, die von Androgenen beeinflusst werden. Einige dieser Wirkungen, wie die Verzögerung der Pubertät, die Hemmung der Spermatogenese oder die Atrophie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sind eher geschlechtsspezifisch, während andere Wirkungen, wie die verzögerte Knochenreifung oder die Entwicklungshemmung des Körpergewichts, weniger geschlechtsspezifisch sind (*Neumann, 1982; Neumann & Topert, 1986*). In Nagerexperimenten wurde insbesondere unter dem Einfluss von CPA eine Verzögerung der Knochenreifung und des Längenwachstums der Knochen nachgewiesen (*Hertel et al., 1969; Schenck & Neumann, 1973*).

2.2.2 Wirkung von Estrogen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung

In ersten Untersuchungen wurde die Wirkung estrogenen Substanzen mit EE₂ (20 ng/g Ei) und BPA (75, 150 oder 300 µg/g Ei) als Modellsubstanzen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass estrogen wirksame ED vor allem die Geschlechtsdifferenzierung männlicher Embryonen beeinflussen und zu einer Verweiblichung genetischer Männchen führen. Doch auch die Geschlechtsorgane weiblicher Embryonen wurden signifikant beeinflusst (*Jessl et al., 2018a*).

Männchen

Die Gabe von EE₂ führte auf morphologischer Ebene zur Ausbildung von Ovotestes, die in Größe und Erscheinung den Ovarien weiblicher Embryonen glichen. Vor allem die rechte Hodenfläche war signifikant kleiner als die von unbehandelten Embryonen, vergleichbar mit unbehandelten Ovarien. Obwohl sich der linke Hoden in seiner Fläche nicht veränderte, zeigte er ein völlig anderes Erscheinungsbild, indem er sich zu einem Ovotestis differenzierte, mit einem unter dem Stereomikroskop durchscheinenden Cortex, ähnlich dem von unbehandelten Weibchen. Im Gegensatz dazu hatte BPA in keiner der getesteten Konzentrationen einen Einfluss auf die Hodenflächen.

Auf histologischer Ebene führte sowohl die Gabe von EE₂ als auch von BPA in allen Behandlungsgruppen zu einer konzentrationsabhängigen und signifikanten Zunahme der Cortexdicke des linken Hodens. Die Medulla des linken Hodens war zum Teil von *Lacunae* durchzogen. Dabei waren die durch EE₂ hervorgerufenen Effekte deutlich stärker ausgeprägt als die von BPA. Der Prozentsatz an *Tubuli seminiferi* des linken Hodens reduzierte sich bei Gabe von EE₂ signifikant, während dieser Effekt bei allen Konzentrationen von BPA ausblieb.

Die dargestellten Ergebnisse decken sich mit den Befunden in der Literatur. Die Exposition männlicher Vogelembryonen, wie Haushuhn, Wachtel und weiterer Spezies, gegenüber Estrogen und estrogen aktiven ED resultiert klassischerweise in einer effektiven Feminisierung der Geschlechtsorgane (*Berg et al., 2001, 1998, 1999; Berg, Holm, et al., 2001; Etches & Kagami, 1997; Intarapat et al., 2014; Mentor et al., 2020b; Romanoff, 1960; Samsel et al., 1982; Scheib & Reysbrion, 1979; Shibuya et al., 2004; Sotonyi & Csaba, 1986; Wolff, 1979*). Auch können sowohl der rechte als auch der linke MD bzw. Ovidukt genetischer Männchen bei Estrogenexposition weiterbestehen (*Berg et al., 1999; Fry & Toone, 1981*). Die Ausbildung sogenannter Ovotestes wurde bereits in den 1930er Jahren mit Versuchen am Hühnerembryo gezeigt (*Kozelka & Gallagher, 1934; Willier et al., 1935*). Dabei entwickelt sich der linke Hoden zu einem Ovotestis, welcher größer und flacher als ein normaler Hoden ist, während sich der rechte Hoden verkleinert oder zurückbildet (*Mattsson et al., 2011*). Auch das Vorhandensein eines ovarähnlichen Cortex, welcher die medullären Geschlechtsstränge umgibt und zum Teil eizellähnliche Keimzellen in der meiotischen Prophase beinhaltet, ist charakteristisch für einen Ovotestis (*Berg et al., 1999; Fry & Toone, 1981; Mentor et al., 2020b; Scheib, 1983*). Die Bildung eines Ovotestis wurde bei Embryonen des Haushuhns sowie weiterer Vogelspezies beobachtet, die E₂, EE₂, DES, PPT, *o,p'*-DDT, BPA, dem BPA-Metabolit 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP) oder den BPA-Ersatzstoffen Bisphenol AF (BPAF) und Bisphenol F (BPF) ausgesetzt waren (*Berg et al., 2001, 1999; Ellis et al., 2012; Esener & Bozkurt, 2018; Fry & Toone, 1981; Gong et al., 1999; Mattsson et al., 2008; Mentor et al., 2020a, 2020b; Perrin et al., 1995; Shibuya et al., 2005*). Eine mögliche Erklärung für die Bildung eines Ovotestis ist die Änderung der hormonellen Balance zwischen Estrogen und Androgen in den männlichen Keimdrüsen. Es wird vermutet, dass im Stadium der Gonadendifferenzierung in den Hoden männlicher Embryonen mehr Androgene als Estrogene synthetisiert werden (*Scheib et al., 1981; Willier, 1952*). Untersuchungen an Wachtel- und Hühnerembryonen zeigen, dass männliche Tiere insgesamt eine höhere Androgenkonzentration aufweisen als weibliche Tiere, während die E₂-Konzentration in weiblichen Embryonen signifikant höher ist als in männlichen Individuen (*Ottinger et al., 2001; Woods & Brazzill, 1981*). Basierend auf der relativen Konzentration von Estrogen und Testosteron differenzieren sich die Gonaden dann zu Testes oder Ovarien (*Stevens, 1997*). In diesem Stadium liegt bei den estrogenexponierten Ovotestis-Männchen vermutlich ein wesentlich höherer Estrogen- als Androgenspiegel vor (*Intarapat et al., 2014*).

Auch eine Beeinflussung der *Tubuli seminiferi* wird exogenen Estrogenen zugeschrieben. So bewirkt die Verabreichung hoher Dosen DES, Genistein oder *o,p'*-DDT einen Rückgang des

absoluten Volumens bzw. der prozentualen Volumendichte der *Tubuli seminiferi* in embryonalen Hühnerhoden (Aktas et al., 2008; Blomqvist et al., 2006; Esener & Bozkurt, 2018). Die Exposition männlicher Möwenembryonen gegenüber *o,p'*-DDT und Methoxychlor führt zu Intersexualität, welche sich unter anderem durch eine deutliche reduzierte Anzahl an *Tubuli seminiferi* charakterisiert (Fry & Toone, 1981). Die Wirkung von Estrogen auf das sich entwickelnde Keimdrüsengewebe werden wahrscheinlich über die Bindung an den ER vermittelt (Brunstrom et al., 2003; Mattsson & Brunstrom, 2017). Estrogen ist an der Proliferation der Keimepithelzellen der männlichen embryonalen Keimdrüsen am embryonalen Entwicklungstag E7-8 beteiligt (Romanoff, 1960). Verschiedene Untersuchungen weisen die Anwesenheit von ER oder ER-mRNA in den Keimepithelzellen männlicher linker Hoden nach (Intarapat et al., 2016; Nakabayashi et al., 1998; Smith et al., 1997). Diese Keimepithelzellen wurden bereits als Estrogen-Zielzellen identifiziert, welche über den ER wirken (Morán, 2005). Die vorübergehende Expression von ER α in den Hoden männlicher Embryonen erklärt die Anfälligkeit gegenüber exogenem E₂ (Andrews et al., 1997; Gasc, 1980; Intarapat & Stern, 2014; Nakabayashi et al., 1998; Smith et al., 1997; Smith & Sinclair, 2004), welche sich in einer Feminisierung der männlichen Geschlechtsmerkmale ausprägt.

Weibchen

Bei Gabe von EE₂ reduzierte sich die rechte Ovarfläche signifikant, während vergleichbare BPA-Effekte ausblieben. Umgedreht erhöhte BPA die Fläche des linken Ovars in einer Konzentration von 75 µg/g signifikant, während vergleichbare EE₂-Effekte ausblieben.

Auf histologischer Ebene führte die Gabe von BPA und EE₂ im linken Ovar zu einem signifikanten, im Fall von BPA nicht konzentrationsabhängigen Rückgang der Cortexdicke.

Auch für weibliche Vogelembrionen gibt es zahlreiche Literatur zu den Effekten estrogen wirksamer Substanzen auf die (gonadale) Geschlechtsdifferenzierung. So führt die embryonale Exposition gegenüber Estrogenen, wie *o,p'*-DDT, EE₂, BPA und DES sowie weiterer estrogen wirksamer Substanzen, vor allem zu Anomalien der MD bzw. der Ovidukte. Häufig kommt es zu einer unnatürlichen Erhaltung des rechten MD, sodass sich beide MD zu Eileitern entwickeln, die im Adultstadium missgebildet, zum Teil verkürzt und funktionell beeinträchtigt sind (Berg et al., 2004, 1999; Fry & Toone, 1981; Greenwood & Blyth, 1938; Halldin et al., 2003; Mattsson & Brunstrom, 2017). Während bei *o,p'*-DDT-exponierten Möwenembryonen die Ovidukte abnormal entwickelt sind, erscheinen die Ovarien strukturell unverändert (Fry & Toone, 1981). Auch werden mit Flüssigkeit gefüllte Bläschen entlang der MD beschrieben (Berg et al., 1999; Mentor et al., 2020a; Willier et al., 1935). Es ist erwähnenswert, dass es

innerhalb der Klasse der Vögel unterschiedlich sensitive Spezies zu geben scheint. Während vor allem der Wachtelembryo besonders sensitiv mit Missbildungen der MD bzw. Ovidukte auf estrogene ED reagiert, scheint der Hühnerembryo wenig sensitiv für diesen Endpunkt, und vergleichbare anatomische Fehlbildungen bleiben aus oder sind deutlich schwächer ausgeprägt (*Berg et al., 2004, 2001, 1999; Mentor et al., 2020a, 2020b*).

Weitere Autoren berichten bei Exposition weiblicher Hühnerembryonen gegenüber MBP, einem BPA-Metaboliten, von kleineren bzw. schmalen linken Ovarien und einer reduzierten Gonadenfläche (*Mentor et al., 2020a*). Bei Behandlung mit BPA, BPAF, BPF und Bisphenol S (BPS) sind Form und Größe der Ovarien unverändert, einige BPS-behandelte Tiere weisen jedoch ein etwas schmaleres, möglicherweise atrophisches linkes Ovar auf (*Mentor et al., 2020b*). *Scheib (1983)* beschreibt bei mit DES behandelten Wachtelembryonen eine Größenreduzierung beider Gonaden, aber keine Beeinflussung der generellen Differenzierung. Ein kleiner linker Eierstock steht mutmaßlich im Zusammenhang mit den Auswirkungen einer Exposition gegenüber Antiestrogenen oder Hemmstoffen der Estrogensynthese und kann ein Zeichen für eine gestörte weibliche Entwicklung sein (*Burke & Henry, 1999; Mentor et al., 2020b; Scheib, 1983*). Die Studie von *Eldefrawy et al. (2021)*, die mit BPA und BPS behandelte adulte Hühner untersucht, zeigt morphologische Veränderungen sowohl der Ovargröße als auch der Follikelentwicklung, was sich zum Teil mit eigenen Untersuchungsergebnissen deckt. Obwohl in der Studie kein Effekt auf die Länge der Ovarien festgestellt werden kann, liegt ein signifikant höheres Ovargewicht vor. Die Autoren folgern, dass die komplizierten Wechselwirkungen, die zwischen den eingesetzten Chemikalien und der Steroidogenese bestehen, wahrscheinlich durch ihre xenoestrogenen Aktivitäten am ER, insbesondere am ER α , vermittelt werden. Dies führt zu Veränderungen des mRNA-Expressionsniveaus bestimmter Gene und der nachfolgenden Signalwege, die unter anderem mit der Ovarfunktion in Zusammenhang stehen (*Eldefrawy et al., 2021*). So könnten die estrogenen Substanzen mit dem ER interagieren und diesen aktivieren, jedoch nicht die Wirksamkeit von endogenem Estrogen erreichen (*Mentor et al., 2020a*). Bei weiblichen Embryonen, die ein erhöhtes Estrogenelevel aufweisen (*Ottinger et al., 2001; Woods & Brazzill, 1981*), kann eine partielle Aktivierung des ER die natürliche estrogeninduzierte Aktivierung des ER α stören (*Mentor et al., 2020a*) und somit beispielsweise zur Fehlbildung des Ovars, inklusive einer reduzierten Cortexdicke, führen.

Der in der vorliegenden Arbeit gefundene Unterschied zwischen der Behandlung weiblicher Embryonen mit EE₂ und BPA lässt sich möglicherweise durch ihre Wirkweise erklären. Viele der bekannten estrogenen ED wirken, indem sie einen oder beide Subtypen der nukleären ER aktivieren. Diese fungieren als Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung ihrer Liganden Dimere ausbilden, welche wiederum an die regulatorischen Regionen spezifischer Zielgene, sogenannte *Estrogen Response Elements*, binden und deren Expression regulieren können. Die Subtypen ER α und ER β weisen unterschiedliche Expressionsmuster auf. Sie können ähnliche, spezifische oder sogar gegensätzliche Wirkungen auf die Genexpression hervorrufen und vermitteln daher zum Teil unterschiedliche biologische und physiologische Funktionen (Jia et al., 2015; Leitman et al., 2010). Darüber hinaus können ER α und ER β durch verschiedene estrogenen ED unterschiedlich aktiviert werden (Mattsson & Brunstrom, 2017). So zeigt BPA eine höhere Affinität für ER β , während EE₂ bevorzugt ER α bindet (Hanafy et al., 2005, 2004). BPA wirkt sowohl über estrogenabhängige als auch -unabhängige Wege (Gao et al., 2015; Huang et al., 2019) und hat nicht nur estrogenen Eigenschaften, sondern auch eine antiandrogene Wirkung (Wang et al., 2017). Bei Vogelembryonen induziert BPA eine estrogenähnliche Entwicklungstoxizität durch Bindung an klassische und nicht klassische ER (Berg et al., 2001; Halldin et al., 2001; Kurosawa et al., 2002) und unterdrückt die Fortpflanzungsprozesse (Berg et al., 2001; Furuya et al., 2006, 2003; Panzica et al., 2005).

2.2.3 Wirkung von Antiestrogen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung

Als nächstes wurden Fulvestrant (0,1, 1 oder 10 $\mu\text{g/g}$ Ei) und Tamoxifen (0,1, 1 oder 10 $\mu\text{g/g}$ Ei) als Modellsubstanzen zur Untersuchung möglicher antiestrogenen Effekte beim Hühnerembryo herangezogen. Daneben sollte auch untersucht werden, inwieweit die Effekte des bekannten Estrogens EE₂ (20 ng/g Ei) durch die simultane Antiestrogen-Gabe kompensiert werden können (Jessl et al., 2018b).

Aufbauend auf den Ergebnissen der Untersuchungen mit Fulvestrant und Tamoxifen wurden nach erweiterter Literaturrecherche zwei weitere Substanzen mit potentiell antiestrogenen Wirkung, Terbutryn (170 $\mu\text{g/g}$ Ei) und TBP (5, 50 oder 85 $\mu\text{g/g}$ Ei), getestet (unveröffentlichte Ergebnisse).

Männchen

Wie in der vorangegangenen Untersuchung mit den Estrogenen EE₂ und BPA (Jessl et al., 2018a), führte die Gabe von EE₂ zu einer deutlichen Feminisierung männlicher Embryonen, die sich durch die Ausbildung weibchenähnlicher Gonaden mit sichtbarer Cortexregion und einem gleichzeitigen Rückgang des Prozentsatzes an *Tubuli seminiferi* charakterisierte. Fulvestrant

sowie Tamoxifen alleine verabreicht hatte in keiner der getesteten Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung der Männchen. Beide Antiöstrogene waren jedoch in der Lage, die feminisierenden Effekte von EE₂ zu antagonisieren. So führte die Verabreichung geringer Konzentrationen der Antiöstrogene zu einer partiellen Neutralisierung der durch EE₂ induzierten Effekte, während höhere Konzentrationen in einer vollständigen Antagonisierung der EE₂-Effekte resultierten.

In Folgeuntersuchungen bewirkte Terbutryn (170 µg/g Ei) bei genetischen Männchen eine beidseitige signifikante Verringerung der Gonadenfläche sowie eine starke Zunahme des prozentualen Anteils an *Tubuli seminiferi* in der linken Gonade, während sich TBP-behandelte Gruppen nicht von den Kontrollgruppen unterschieden. Beide Substanzen wurden zuvor noch nicht auf antiöstrogene Effekte in Vögeln getestet, zeigen aber in anderen Vertebraten, wie Ratte, Maus und Fisch sowie *in vitro* unter Verwendung humaner nukleärer Rezeptoren verschiedene Effekte (Kojima *et al.*, 2013; Velisek *et al.*, 2011; WHO/IPCS, 1991). So wird beispielsweise bei histopathologischer Untersuchung TBP-behandelter Ratten eine degenerative Veränderung der *Tubuli seminiferi* der Hoden beschrieben (Laham *et al.*, 1984). Darüber hinaus ist Terbutryn als potentieller ED gelistet (ECHA, 2023; PPDB, 2023; USEPA, 2012b). In der Literatur lassen sich keine vergleichbaren Studien an Vögeln finden, die eine Erklärung oder Hinweise auf die gefundenen Effekte liefern. Es ist nicht auszuschließen, dass die Substanz eine abseits der vermuteten Antiöstrogenität liegende Wirkung hat, die die genannten Effekte bedingt. Hier wären weiterführende Experimente und die Untersuchung weiterer Substanzdosen nötig, um mögliche Substanzeffekte näher zu untersuchen.

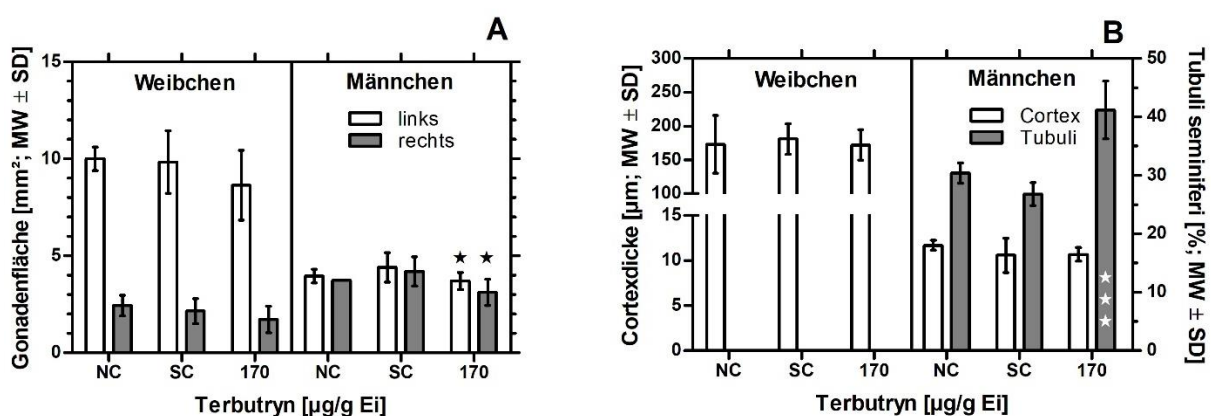


Abbildung 5: Effekte der In-ovo-Exposition gegenüber Terbutryn (170 µg/g Ei) auf die rechte und linke Gonadenfläche (A) sowie die Cortexdicke und den prozentualen Anteil an *Tubuli seminiferi* der linken Gonade (B) von Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA und Dunnett's post Test gegen die Lösemittelkontrolle (SC). Negativkontrolle (NC). 5A: NC: n_{Männchen}=2, n_{Weibchen}=9; SC: n_{Männchen}=5, n_{Weibchen}=8; Terbutryn: n_{Männchen}=12, n_{Weibchen}=8. 5B: NC: n_{Männchen}=3, n_{Weibchen}=9; SC: n_{Männchen}=6, n_{Weibchen}=8; Terbutryn: n_{Männchen}=12, n_{Weibchen}=8. Signifikanzlevel: * p<0,05; *** p<0,001. Unveröffentlichte Daten.

Da der ER bei Vögeln weitgehend irrelevant für die Geschlechtsdifferenzierung männlicher Vögel ist, führt die Gabe von Antiestrogenen, wie Atrazin, Imazalil oder Tamoxifen bei genetischen Männchen zu keiner substanzbedingten Fehldifferenzierung bzw. Größenänderung der embryonalen Gonaden (*Koo et al., 1985; Matsushita et al., 2006; Salzgeber et al., 1981*). Dagegen resultiert die Behandlung mit Tamoxifen im Adultstadium von Hähnen in einem erhöhten Plasmatestosteronlevel, in einer verfrühten Pubertät und in einer gesteigerten Spermaproduktion (*Robinzon et al., 1990; Rozenboim et al., 1989*).

Wenngleich die relevante Literatur einen fehlenden Einfluss auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung der männlichen Embryonen durch Antiestrogen-Behandlung beschreibt, können die durch die Verabreichung von Estrogenen hervorgerufenen feminisierenden Effekte durch die simultane Gabe von Antiestrogenen abgeschwächt oder vollkommen kompensiert werden (*Jessl et al., 2018b; Salzgeber et al., 1981; Samsel et al., 1982; Scheib, 1983; Weniger et al., 1981*). Es ist anzunehmen, dass die Konkurrenz zwischen Estrogen und Antiestrogen an der Bindungsstelle des ER von ihren unterschiedlichen Konzentrationen, aber auch von ihrer spezifischen Bindungsaffinität zum Rezeptor beeinflusst wird. So zeigen EE₂, Tamoxifen bzw. Fulvestrant relative Bindungsaffinitäten von 190%, 1,6% bzw. 37,5% an den ER aus Zytosolpräparaten des Rattenuterus (*Blair et al., 2000*). Eine hohe Estrogen-Konzentration führt zu einer bevorzugten Bindung der Substanz an ihren Rezeptor und damit zu einer Feminisierung männlicher Gonaden. Mit zunehmender Konzentration des Antiestrogens wird der ER sukzessive geblockt. Da in den der vorliegenden Dissertation zugrunde liegenden Untersuchungen die beiden Antiestrogene Tamoxifen und Fulvestrant in Dosen angewendet wurden, die um den Faktor 500 höher waren als das verwendete Estrogen EE₂, ist es wahrscheinlich, dass das Estrogen schrittweise aus dem ER verdrängt wurde, was zu einer Neutralisierung der Estrogenantwort führte.

Weibchen

Die weibliche Geschlechtsdifferenzierung wurde vor allem durch die Gabe von Tamoxifen beeinflusst. In der höchsten Dosierung von 10 µg/g Ei führte Tamoxifen zu einer signifikanten Größenreduktion des linken Ovars und in allen eingesetzten Dosierungen (0,1, 1 oder 10 µg/g Ei) zu Missbildungen des linken ovariellen Cortex. Fulvestrant dagegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung der Weibchen. Lediglich in den beiden niedrigen Dosierungen von 0,1 und 1 µg Fulvestrant/g Ei gab es eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu einem vergrößerten rechten und linken Ovar sowie einer marginal verringerten Cortexdicke des linken Ovars. Die höchste Dosierung von 10 µg Fulvestrant/g Ei

ließ weder makroskopisch noch histologisch signifikante Effekte auf die Gonadogenese erkennen.

Die gleichzeitige Exposition gegenüber EE₂ (20 ng/g Ei) und Tamoxifen (0,1 oder 1 µg/g Ei) bzw. Fulvestrant (10 µg/g Ei) führte auf morphologischer Ebene zu einer statistisch signifikanten Zunahme der linken Ovarfläche. Eine Tamoxifen-Dosis von 10 µg/g Ei war in der Lage, diesen Effekt umzukehren und resultierte in einer signifikanten Reduzierung der linken Ovarfläche analog zur Einzelbehandlung mit Tamoxifen. Histologisch war kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen estrogenen bzw. antiestrogenen Einzelsubstanzen und der Kombination von Estrogen und Antiestrogen feststellbar.

Analog zu Fulvestrant kam es bei Einsatz von Terbutryn und TBP zu keiner Beeinflussung der weiblichen Gonadendifferenzierung. Bei Verabreichung von Terbutryn zeigten sich ausschließlich marginale Effekte auf die Geschlechtsdifferenzierung der Weibchen. Wenngleich die höchste TBP-Dosis (85 µg/g Ei) eine signifikante Vergrößerung der weiblichen linken Gonadenfläche auslöste, so lässt dieses Ergebnis aufgrund einer ungenügenden Quantität analysierbarer Individuen, hervorgerufen durch eine dosisbedingte Steigerung der Mortalität, keine statistisch abgesicherte Aussage zu.

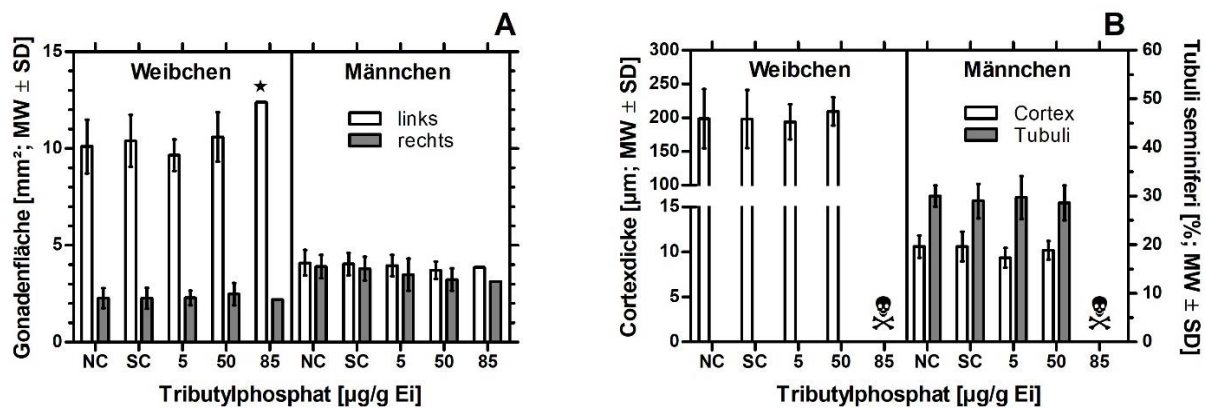


Abbildung 6: Effekte der In-ovo-Exposition gegenüber Tributylphosphat (TBP; 5, 50 oder 85 µg/g Ei) auf die linke und rechte Gonadenfläche (A) sowie die Cortexdicke und den prozentualen Anteil an *Tubuli seminiferi* der linken Gonade (B) von Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA und Dunnett's post Test (A, B) oder Kruskal-Wallis und Dunn's post Test (B, Cortexdicke Weibchen) gegen die Lösemittelkontrolle (SC). Negativkontrolle (NC). 6A: NC: nMännchen=13, nWeibchen=20; SC: nMännchen=16, nWeibchen=39; TBP 5 µg/g Ei: nMännchen=10, nWeibchen=11; TBP 50 µg/g Ei: nMännchen=7, nWeibchen=5; TBP 85 µg/g Ei: nMännchen/Weibchen=1. 6B: NC: nMännchen=14, nWeibchen=19; SC: nMännchen=17, nWeibchen=20; TBP 5 µg/g Ei: nMännchen=10, nWeibchen=11; TBP 50 µg/g Ei: nMännchen=7, nWeibchen=5; TBP 85 µg/g Ei: nMännchen/Weibchen=0. Signifikanzlevel: * p<0,05. Unveröffentlichte Daten. Schädel-Symbol: Die hohe Mortalität in der Behandlungsgruppe mit TBP 85 µg/g Ei führte dazu, dass kein verwertbares Gonadengewebe für histologische Untersuchungen verfügbar war.

Bei Antiestrogenen handelt es sich um Substanzen, die die Wirkung des Steroidhormons Estrogen hemmen. So betreffen die durch Antiestrogene hervorgerufenen Effekte vor allem weibliche Vogelembryonen. Es ist zwischen Aromatasehemmern, reinen Antiestrogenen und selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) zu unterscheiden. Aufgrund seiner höheren ER-Affinität im Vergleich zu Tamoxifen (*Wakeling & Bowler, 1987; Wakeling et al., 1991*) und der Tatsache, dass die Behandlung mit Fulvestrant zu einer vollständigen Hemmung des Estrogen-Signalwegs führt (*Osborne et al., 1995; Wakeling, 1995; Wardley, 2002*), wurde erwartet, dass Fulvestrant das stärkere Antiestrogen ist. Der Unterschied zwischen Fulvestrant und Tamoxifen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Geschlechtsdifferenzierung der Gonaden von *G. gallus domesticus* könnte auf ihre Wirkungsweise zurückzuführen sein, da der SERM Tamoxifen je nach Zielgewebe ein partieller ER-Antagonist ist und damit sowohl eine antiestrogene als auch eine estrogenartige Aktivität aufweist, Fulvestrant jedoch ein reiner (oder kompetitiver) ER-Antagonist ohne intrinsische Aktivität ist (*Bentrem et al., 2001; MacGregor & Jordan, 1998; Shou et al., 2004; Webb et al., 1995*). Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Unterschiede die Aktivität *in ovo* beeinflussen können.

Auch Aromatasehemmer führen bei In-ovo-Administration bei Vogelembryonen zu einer Fehldifferenzierung der Gonaden genetischer Weibchen. Sie verhindern durch die Inhibierung des Enzyms Aromatase die Umwandlung von Androgen in Estrogen, ein Prozess der auch als Aromatisierung bekannt ist. Dies führt zu einem Stopp der Estrogensynthese in den Gonaden und resultiert schließlich in einer Maskulinisierung der Ovarien genetischer Weibchen (*Burke & Henry, 1999; Elbrecht & Smith, 1992*). Substanzen, welche die Aktivität des Aromataseenzym blockieren, erhöhen den Androgenspiegel, und senken gleichzeitig den Estrogenspiegel. Durch das veränderte Androgen-Estrogen-Verhältnis wird die Geschlechtsdifferenzierung tendenziell in Richtung des phänotypisch männlichen Geschlechts verschoben. Es konnten bereits verschiedene Pflanzenextrakte, beispielsweise aus Knoblauch und Tomate, identifiziert werden, welche eine aromatasehemmende Wirkung auf die Embryonalentwicklung von Vogelembryonen ausüben (*Abdulateef et al., 2021; Fazli et al., 2015; Valizadeh & Seratinouri, 2013*). Auch die bekannten Aromatasehemmer Fadrozol und Imazalil führen bei In-ovo-Administration von Hühnerembryonen und weiterer Vogelspezies zu einem hohen Prozentsatz maskulinisierter genetischer Weibchen. Auf morphologischer Ebene differenzieren sich die Gonaden paarig mit der eindeutigen Erscheinung von Testes (oder Ovotestes), während histologische Untersuchungen die Bildung von *Tubuli seminiferi* oder degenerierte Ovarfollikel offenlegen (*Burke & Henry, 1999; Matsushita et al., 2006; Vaillant et al., 2001a, 2001b*). Ähnliche Ergebnisse liefert die Verabreichung der SERM Tamoxifen

oder Clomiphen an Hühnerembryonen. Bei makroskopischer Befundung der äußeren Genitalien wird eine signifikant höhere Anzahl phänotypischer Männchen detektiert (*Coco et al., 1992; Fazli et al., 2015; Valizadeh & Seratinouri, 2013*). Es kann eine inhibierte Regression des rechten Ovars beobachtet werden, welches makroskopisch eine testisähnliche äußere Erscheinung (*Salzgeber et al., 1981; Scheib, 1983*) und histologisch eine zum Teil tubuläre Struktur aufweist (*Koo et al., 1985*). Das linke Ovar ist in seiner Größe reduziert und weist eine dicht gepackte Medulla sowie einen reduzierten Cortex auf (*Salzgeber et al., 1981; Scheib, 1983*).

Während die alleinige Gabe des Antiöstrogens Tamoxifen in einer Maskulinisierung genetischer Weibchen, inklusive einer symmetrischen Größenannäherung beider Gonaden und einer Cortexreduzierung des linken Ovars resultiert, und die alleinige Gabe des Östrogens DES das Volumen des linken Eierstocks reduziert, aber seine Differenzierung nicht beeinträchtigt, führt die simultane Gabe beider Substanzen zu einer Reduktion der durch das Antiöstrogen induzierten Effekte (*Scheib, 1983*). Ganz anders der in der vorliegenden Dissertation gefundene Effekt einer signifikant vergrößerten linken Gonadenfläche bei Co-Exposition von EE₂ und Tamoxifen bzw. Fulvestrant. Hier scheint sich erst die Kombination östrogenen und antiöstrogenen Substanzen zu einem Effekt aufzusummieren, welcher bei Einzelgabe der östrogenen oder antiöstrogenen Substanzen nicht auftritt. Während die simultane Gabe von EE₂ (20 ng/g Ei) und 10 µg Fulvestrant/g Ei zum genannten Effekt führt, ist Tamoxifen bereits bei 100fach niedrigerer Dosis in der Lage, einen signifikanten Effekt hervorzurufen. Bei einer Dosis von 10 µg Tamoxifen/g Ei überwiegt schließlich das Antiöstrogen, und es kommt zu Effekten analog der alleinigen Behandlung mit Tamoxifen, nämlich einer signifikant verringerten linken Ovarfläche. In der Literatur wurden für den Hühnerembryo keine vergleichbaren Studien mit einer Erklärung gefunden. Um dies zu beleuchten, wären weiterführende Untersuchungen mit weiteren (anti)östrogenen Substanzen und Dosierungen nötig.

2.2.4 Wirkung von Androgen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung

Aufgrund ihrer östrogenabhängigen Geschlechtsdifferenzierung stand bei Vögeln in der Vergangenheit vor allem die Untersuchung der Effekte (anti)östrogenen Substanzen im Mittelpunkt der Forschung. Im Vergleich dazu fällt die Datenlage bei potentiell androgenen ED deutlich übersichtlicher aus. Die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass auch Substanzen mit (anti)androgenen Wirkungsweisen in die Betrachtung möglicher Effekte miteinbezogen werden sollten (*Niemann et al., 2010*).

Zur Untersuchung androgener Effekte dienten TBT (0,5, 3, 10 oder 30 pg TBT-Sn/g Ei) und Methyltestosteron (MT; 30 pg/g Ei) als Modellsubstanzen. Als Lösemittel diente Sesamöl. Ziel der Studie war es, die durch den bekannten ED TBT induzierten morphologischen Veränderungen des Hühnerembryos mit der zugrunde liegenden Genexpression zu verbinden. Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien werden der Vollständigkeit halber erwähnt, jedoch nicht näher beleuchtet, da sie Teil der Dissertation von Dr. Jessica Scheider sind (*Scheider, 2019; Scheider et al., 2018*). Aufbauend auf den Ergebnissen der Untersuchungen mit TBT und MT wurden weitere Versuche mit MT (0,6 oder 10 ng/g Ei) und Trenbolon (1, 3,3 oder 10 ng/g Ei), durchgeführt (unveröffentlichte Ergebnisse). Als Lösemittel diente DMSO.

Männchen

Die Hoden genetischer Männchen der mit TBT oder MT behandelten Gruppen zeigen keinerlei anatomische oder histologische Veränderungen. Auch in weiteren im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Versuchen zeigten sich die Keimdrüsen der Männchen unbeeinflusst durch die eingesetzten androgenen Substanzen MT und Trenbolon (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Literatur zeigt hinsichtlich androgener Substanzen bei Vögeln widersprüchliche Befunde. In Experimenten mit adulten Wachteln führt die MT-Behandlung zu einem reduzierten Testisgewicht (*Niemann et al., 2010*) und einer Inhibierung der Spermatogenese, welche in einer reduzierten Fruchtbarkeit der betroffenen Männchen resultiert (*Niemann et al., 2010; Selzsam et al., 2005*). Demgegenüber stehen Studien an adulten Wachteln, welche bei Behandlung mit MT keine abnormale Entwicklung der Testes (und Ovarien) feststellen (*Shibuya et al., 2004*) sowie bei Behandlung mit Trenbolonacetat (TA) keine Beeinflussung der Histologie der *Tubuli seminiferi* messen können, was eine normale Spermatogenese indiziert (*Henry et al., 2012*). Auch im Hühnerembryo führt exogen zugeführtes TP zu keiner quantifizierbaren Maskulinisierung der embryonalen Keimdrüsen (*Groenendijk-Huijbers & Van Schaik, 1976*).

Bei Vögeln gibt es bisher keinen Hinweis darauf, dass Androgene eine entscheidende Rolle bei der Morphogenese der Hoden spielen, wie es bei Estrogenen mit der Differenzierung der Eierstöcke der Fall ist (*Estermann et al., 2021; Groenendijk-Huijbers & Van Schaik, 1976*). Wenngleich die Gonaden beider Geschlechter den AR exprimieren, so ist dieser bei weiblichen Individuen stets höher exprimiert als bei männlichen. So sind Androgene und AR-Signale bei Vögeln wesentlich für die Entwicklung der Ovarien, nicht aber für die Entwicklung der Hoden. So liegt die Vermutung nahe, dass gonadenbezogene Endpunkte bei (männlichen) Vögeln

unergiebig für die Untersuchung androgener Wirkpotentiale sind, da diese keine relevanten Zielgewebe für androgene Substanzen darstellen. Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass weitere Zielorgane, wie die *Bursa fabricii*, ein lymphatisches Organ von Vögeln, welches im Endbereich der Kloake lokalisiert ist, oder die Schaum produzierende Kloakaldrüse bei Wachtel und Huhn aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Androgenen geeignetere Endpunkte für den Nachweis androgener Substanzen darstellen. So ist bekannt, dass die In-ovo-Verabreichung von Testosteron das normale Wachstum und die Entwicklung der *Bursa fabricii* blockiert (Burke, 1996; Glick, 1983; Henry & Burke, 1999; Quinn & Ottinger, 2006; Utsumi & Yoshimura, 2009). Auch das Kloakaldrüsenwachstum wird durch beispielsweise TA in der Wachtel beeinträchtigt (Quinn & Ottinger, 2006; Quinn et al., 2007a).

Weibchen

Die Gabe von TBT und MT führt in allen Behandlungsgruppen zu einer anatomischen Virilisierung weiblicher Gonaden. Diese umfasste die Entwicklung einer längeren rechten und/oder einer runderen linken Gonade, die den anatomischen Eigenschaften eines sich entwickelnden Ovotestis ähnelten. Auf histologischer Ebene zeichnete sich der virilisierende Effekt hauptsächlich durch eine signifikante Reduktion des linken Cortex weiblicher Gonaden aus. Darüber hinaus ermöglichte die substanzbedingte Veränderung der Gonaden die Identifizierung unterschiedlich exprimierter Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, die mit diesem Phänotyp in E19-Embryonen assoziiert sind. Es war daher möglich, die phänotypische Veränderung mit genetischen Faktoren zu verknüpfen.

In einer weiteren, im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Versuchsreihe wurden Untersuchungen mit den Androgenen MT und Trenbolon durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Keimdrüsen weiblicher Embryonen unbeeinflusst durch die eingesetzten androgenen Substanzen blieben (unveröffentlichte Ergebnisse). Eine offenkundige Ursache für die Diskrepanz zwischen den MT-Ergebnissen der TBT-/MT- und der MT-/Trenbolon-Untersuchungen ist nicht bekannt, kann jedoch in den Unterschieden der Versuchsdurchführung wie den verwendeten Lösemitteln, den untersuchten Endpunkten, dem eingesetzten Konzentrationsbereich und der Anzahl untersuchter Embryonen begründet liegen. An dieser Stelle kann erwähnt werden, dass die in der TBT-/MT-Versuchsreihe mit dem Lösemittel Sesamöl behandelte Kontrollgruppe zu einer im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nicht signifikanten Virilisierung der weiblichen Gonaden führte. Sesamöl wurde bereits in verschiedenen Studien zur Untersuchung von ED in Vertebraten eingesetzt (Chataigneau et al., 2004; Demissie et al., 2008; Liang et al., 2013). Eine endokrine

Wirksamkeit des Lösemittels Sesamöl ist nicht bekannt. Auch im uterotrophen Assay und im Hershberger Assay zeigt die Untersuchung verschiedener Lösemittel, darunter auch Sesamöl, bei subkutaner Anwendung an Ratten keine Beeinflussung der Geschlechtsorgangewichte (Yamasaki *et al.*, 2001). Eine Literaturrecherche zu Sesamöl ergab keine bekannten Effekte auf die (Geschlechts-)differenzierung von Hühnerembryonen (Eising *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2005). Eine weiterführende Diskussion zu den verwendeten Lösemitteln Sesamöl und DMSO ist in der Dissertation von Dr. Jessica Scheider zu finden (Scheider, 2019).

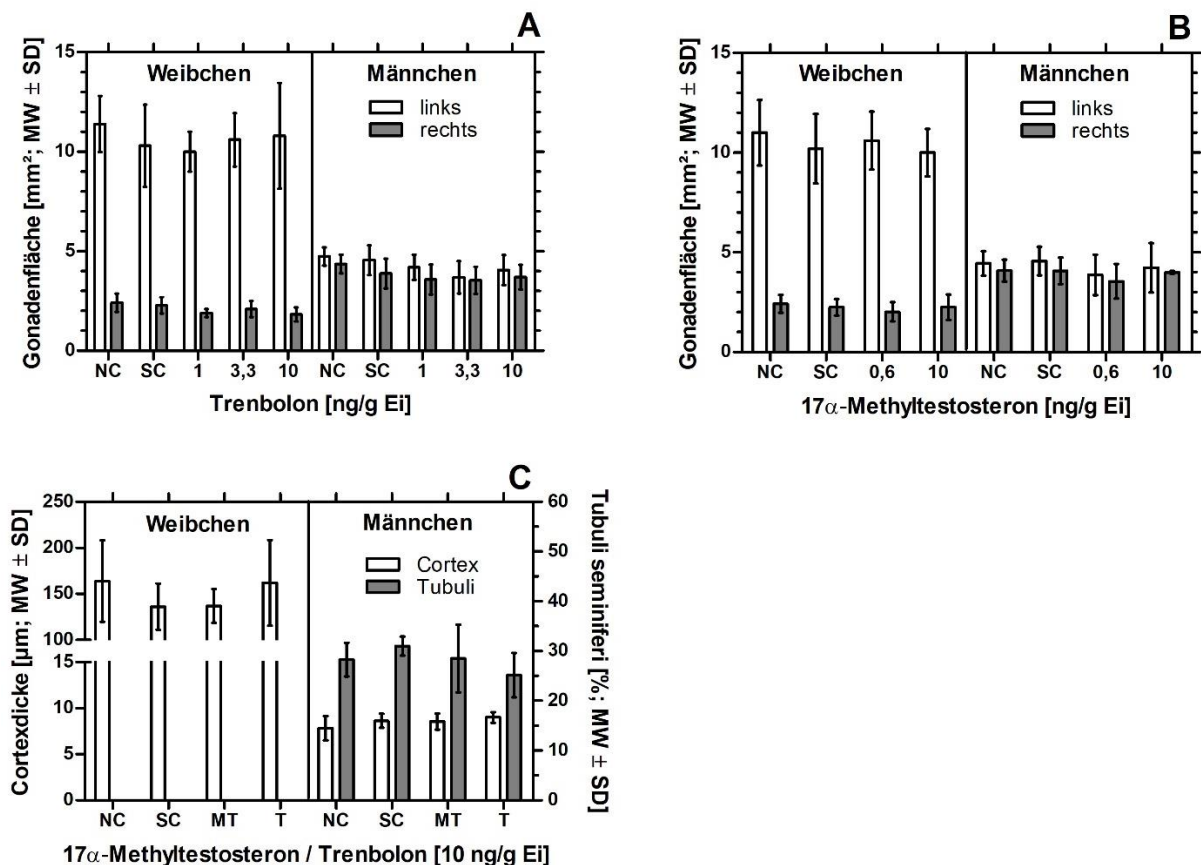


Abbildung 7: Effekte der In-ovo-Exposition gegenüber Trenbolon (T; 1, 3,3 oder 10 ng/g Ei) und 17 α -Methyltestosteron (MT; 0,6 oder 10 ng/g Ei) auf die rechte und linke Gonadenfläche (A, B) sowie die Cortexdicke und den prozentualen Anteil an *Tubuli seminiferi* der linken Gonade (C) von Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) am Tag 19 der embryonalen Entwicklung. Statistische Analyse mittels One-way ANOVA und Dunnett's post Test gegen die Lösemittelkontrolle (SC). Negativkontrolle (NC). 7A: NC: $n_{\text{Männchen}}=12$, $n_{\text{Weibchen}}=10$; SC: $n_{\text{Männchen/Weibchen}}=7$; T 1 ng/g Ei: $n_{\text{Männchen}}=10$, $n_{\text{Weibchen}}=6$; T 3,3 ng/g Ei: $n_{\text{Männchen}}=5$, $n_{\text{Weibchen}}=11$; T 10 ng/g Ei: $n_{\text{Männchen}}=4$, $n_{\text{Weibchen}}=8$. 7B: NC: $n_{\text{Männchen}}=25$, $n_{\text{Weibchen}}=19$; SC: $n_{\text{Männchen/Weibchen}}=13$; MT 0,6 ng/g Ei: $n_{\text{Männchen}}=6$, $n_{\text{Weibchen}}=11$; MT 10 ng/g Ei: $n_{\text{Männchen}}=4$, $n_{\text{Weibchen}}=8$. 7C: NC: $n_{\text{Männchen}}=12$, $n_{\text{Weibchen}}=9$; SC: $n_{\text{Männchen}}=6$, $n_{\text{Weibchen}}=4$; T: $n_{\text{Männchen}}=4$, $n_{\text{Weibchen}}=6$; MT: $n_{\text{Männchen}}=4$, $n_{\text{Weibchen}}=8$. Unveröffentlichte Daten.

Die Keimdrüsen beider Geschlechter sind schon vor Beginn der gonadalen Geschlechtsdifferenzierung steroidogen aktiv. So ist Testosteron bereits in den Keimdrüsen beider Geschlechter an E3,5 nachweisbar und damit rund drei Tage vor Einsetzen der morphologischen Differenzierung der sexuell indifferenten Gonaden zu Ovarien und Testes

(Bruggeman *et al.*, 2002). Der embryonale Hühnerhoden exprimiert bereits in den frühen Stadien der gonadalen Geschlechtsdifferenzierung alle Enzyme, die für die Testosteronsynthese aus Cholesterin erforderlich sind (Ayers *et al.*, 2013; Nishikimi *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass männliche Tiere eine höhere Androgen-Serumkonzentration aufweisen als weibliche Tiere und Testosteron sowie das Testosteron-E₂-Verhältnis in männlichen Tieren signifikant höher ist (Wang *et al.*, 2019). Plasmatestosteron kann beim Huhn bereits an E5,5 im Blut beider Geschlechter nachgewiesen werden. Dabei steigt der männliche Testosteronspiegel ab E7,5 messbar, verglichen mit dem der Weibchen. Damit steht die Testosteron-Plasmakonzentration in direktem Zusammenhang mit der Regression beider männlicher MD und des rechten weiblichen MD (Woods & Podczaski, 1974; Woods *et al.*, 1975). Beginnend mit der Expression von Aromatase ab E6 liefert Androgen das Substrat für die Aromatisierung und die Estrogenproduktion der weiblichen Tiere (Groenendijk-Huijbers & Van Schaik, 1976). Mehrere embryonale Gewebe männlicher und weiblicher Hühner exprimieren den AR. Dabei ist der AR in den weiblichen embryonalen Gonaden, insbesondere dem linken Ovar, im Allgemeinen höher exprimiert als in den männlichen Gonaden (Katoh *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2017). Bei den Weibchen wird eine nukleäre Lokalisation des AR in den Cortexsträngen und den *Lacunae* nachgewiesen, während der AR bei den Männchen eine zytoplasmatische Lokalisierung in den *Tubuli seminiferi* der Keimdrüsen aufweisen. Der mRNA-Spiegel für den AR in weiblichen embryonalen Keimdrüsen ist in allen Entwicklungsstufen höher als der der Männchen. Zusammengefasst verdeutlicht dies, dass Androgene und AR-Signale bei Vögeln wesentlich für die Entwicklung der Ovarien sind, nicht aber für die Entwicklung der Hoden. Die Rolle von Androgenen und AR-Signalen in der Gonadenentwicklung bei Hühnern ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Tanaka *et al.*, 2017).

2.2.5 Wirkung von Antiandrogen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung

Zuletzt wurden mit CPA (0,2, 2 und 20 µg/g Ei), *p,p'*-DDE (0,5, 5 und 50 µg/g Ei) und Flutamid (0,5, 5 und 50 µg/g Ei) die Effekte antiandrogener Substanzen auf die Geschlechtsdifferenzierung von Hühnerembryonen untersucht (Jessel & Oehlmann, 2023).

Männchen

Keine der drei getesteten antiandrogeneren Substanzen CPA, *p,p'*-DDE und Flutamid zeigte einen Effekt auf die gonadenbezogenen morphologischen und histologischen Endpunkte Gonadenfläche, Cortexdicke und prozentuale Fläche der *Tubuli seminiferi*. Die Gonaden beider Geschlechter waren in Größe, Form und Beschaffenheit mit denen der Kontrollgruppen vergleichbar.

Die in der Literatur gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gonadenbezogenen Endpunkte bei männlichen Hühnern und Wachteln durch die Anwesenheit und Wirkung von Antiandrogenen in einem überwiegenden Anteil an Studien unbeeinflusst scheinen. So wird von einem fehlenden Einfluss verschiedener Antiandrogene wie *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, CPA oder Flutamid auf die Gonadenmorphologie sowie -physiologie der Männchen sowohl im Embryonal- als auch im Adultstadium berichtet (*Leitner et al., 1996; Quinn & Ottinger, 2006; Quinn et al., 2008; Utsumi & Yoshimura, 2009*). Demgegenüber stehen wenige Studien, welche durch Antiandrogen-Behandlung hervorgerufene Effekte auf die Differenzierung der Reproduktionsorgane von Vögeln zeigen. So werden bei Behandlung mit Bicalutamid, Flutamid oder DDT ein vermindertes Testisgewicht männlicher Hühner, eine reduzierte Größe der Testes männlicher Zebrafinken oder feminisierte Testes von Möwenembryonen festgestellt (*Fennell et al., 1996; Fry & Toone, 1981; Grisham et al., 2007*). Die Studien zu Huhn und Zebrafink beziehen sich jedoch auf die Behandlung adulter Tiere, sodass der Nachweis potentieller Effekte auf das Reproduktionssystem der Embryonalstadien nicht gegeben ist.

Analog zum Kapitel 2.2.4 (*Wirkung von Androgenen auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung*) geben verschiedene Studien Hinweise darauf, dass weitere Zielorgane, wie die *Bursa fabricii* oder die Kloakaldrüse bei Wachtel und Huhn, aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Androgenen geeignetere Endpunkte für den Nachweis antiandrogener Substanzen darstellen (*Burke, 1996; Glick, 1983; Henry & Burke, 1999; Quinn & Ottinger, 2006; Utsumi & Yoshimura, 2009*). Antiandrogene verhalten sich im Organismus antagonistisch zu Androgenen und sind in der Lage, deren Wirkung weitgehend aufzuheben. Da AR und AR-mRNA in den Kloakaldrüsen der Wachtel produziert werden, stellen diese ein Zielorgan für Androgene dar, sodass die Entwicklung der Kloakaldrüse bei gleichzeitiger Verabreichung von Androgenen wie TP und Antiandrogenen wie CPA, Vinclozolin oder Flutamid effektiv unterdrückt werden kann (*Adkins-Regan & Garcia, 1986; McGary et al., 2001; Utsumi & Yoshimura, 2011, 2009*). Die *Bursa fabricii* erfährt bei Verabreichung von Androgenen wie TP eine signifikante Gewichtsabnahme, während die gleichzeitige Gabe von Antiandrogenen wie Flutamid oder ICI 176,334 (auch bekannt als Casodex) die androgenbedingte Bursalregression aufheben kann (*Burke, 1996; Henry & Burke, 1999; Utsumi & Yoshimura, 2009*).

Weibchen

Analog zu den Ergebnissen der Männchen hatte keine der drei getesteten antiandrogenen Verbindungen CPA, *p,p'*-DDE und Flutamid einen Effekt auf die untersuchten gonadenbezogenen Endpunkte weiblicher Embryonen. Weder morphologisch noch histologisch traten Veränderungen des embryonalen Ovars auf.

Es ist allgemein bekannt, dass Antiandrogene in Säugetieren prinzipiell alle androgenabhängigen Gewebe und Funktionen beeinflussen. Auch bei den Vögeln sind Antiandrogene für ihr hormonell disruptives Potential bekannt, als bekannteste Vertreter sind hier beispielsweise DDT und seine Derivate zu nennen. Angereichert durch die Nahrungskette führt die Substanz bei verschiedenen carnivoren und piscivoren Vogelspezies zu Eischalenverdünnung (*Fry & Toone, 1981; Hickey & Anderson, 1968*). Während viele Greifvögel hoch sensitiv für DDT-assoziierte Eischalenverdünnungen sind, reagieren andere Spezies, wie beispielsweise Huhn oder Wachtel, annähernd unempfindlich bezüglich dieses Endpunkts (*Peakall & Lincer, 1996*). Darüber hinaus berichten verschiedene Studien von einem fehlenden Einfluss verschiedener Antiandrogene, wie *p,p'*-DDE oder CPA, auf die Gonadenmorphologie und -physiologie sowohl im Embryonal- als auch im Adultstadium weiblicher Japanwachteln (*Kamata et al., 2013; Quinn et al., 2008; Utsumi & Yoshimura, 2009*). Während DDE keinen Einfluss auf die Gonadendifferenzierung im Embryonalstadium hat, wird eine Änderung des Reproduktionsverhaltens im Adultstadium weiblicher Hühner beobachtet (*Quinn et al., 2008*).

2.3 Hühnerembryo als Testsystem

In Bezug auf die zu untersuchenden Hypothesen (siehe Kapitel 1.8 *Ziele der Arbeit*) können anhand der vorgestellten Ergebnisse folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die untersuchten morphometrischen Endpunkte eignen sich für den Nachweis toxischer Effekte ausgewählter endokriner Disruptoren auf die Embryonalentwicklung von *Gallus gallus domesticus*.

→ Diese Hypothese wird durch die eigenen Ergebnisse gestützt. Der toxische Einfluss endokriner Verdachtssubstanzen auf die physiologische Embryonalentwicklung von *G. gallus domesticus* lässt sich durch die gewählten morphometrischen Endpunkte Mortalität, Missbildungsrate und Körperlänge einfach und effizient abbilden. Da es sich beim Vogelei um ein System handelt, in dem eine in den Eidotter applizierte Chemikalie während der gesamten Entwicklung in direktem Kontakt mit dem Embryo steht, ist jede potentiell auftretende toxische oder teratogene Wirkung leicht zu beobachten. Es ist bekannt, dass die Empfindlichkeit

gegenüber Giftstoffen bei den verschiedenen Vogelarten sehr unterschiedlich ausfallen kann. Im Allgemeinen reagieren Hühner, einschließlich ihrer Embryonen, von den domestizierten und wildlebenden Vogelarten jedoch häufig am empfindlichsten auf viele der bisher untersuchten Substanzen (*Scanes & McNabb, 2003*). Unter Berücksichtigung der Fähigkeit des Hühnerembryos, entsprechend sensibel auf verschiedene Prüfsubstanzen zu reagieren, scheinen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Endpunkte optimal geeignet, um die toxische Wirkung einer Substanz darzustellen, eine Dosis zu ermitteln, bei der eine erhöhte Mortalität oder Missbildungsrate festzustellen ist oder andere negative Effekte, wie zum Beispiel eine Entwicklungsverzögerung, anzuzeigen. Dabei ist stets ein Vergleich zu den eingesetzten Kontrollgruppen (inkl. historischer Daten) zu ziehen, um natürlich auftretende oder lösungsmittelbedingte Effekte klar unterscheidbar von Substanzeffekten zu machen. Die im Versuch mit dem Antiandrogen CPA detektierte embryonale Wachstumsverzögerung lässt sich durch einen solchen Vergleich beispielsweise direkt auf die erfolgte Substanzbehandlung zurückführen. Darüber hinaus zeigt es, dass sich die gewählten Endpunkte, aber auch das Testsystem als Ganzes, in besonderer Weise für die Identifizierung möglicher substanzbedingter Entwicklungsverzögerungen eignen.

2. Die In-ovo-Exposition von *Gallus gallus domesticus* gegenüber ausgewählten (anti)estrogenen und (anti)androgenen Verbindungen führt zu teratogenen Effekten auf die Gonaden von E19-Embryonen.

→ Diese Hypothese wird bedingt durch die eigenen Resultate unterstützt. Bei Behandlung der Embryonen mit den verschiedenen untersuchten Verbindungen kam es bei einigen, nicht jedoch bei allen Substanzen, zu einer Beeinflussung bzw. Fehldifferenzierung der Gonaden mindestens eines der beiden Geschlechter. Unter Einfluss der Estrogene BPA und EE₂ entwickelten sich die Keimdrüsen der Männchen zu Ootestes, welche in Größe und Form dem weiblichen Ovar glichen und histologisch einen Cortex sowie zum Teil *Lacunae* und einen Rückgang des Anteils an *Tubuli seminiferi* aufwiesen. Auch weibliche Embryonen wurden durch die eingesetzten Estrogene beeinflusst und entwickelten ein Ovar mit deutlich schmalerem Cortex. Unter Einfluss von Antiestrogenen wie Fulvestrant und Tamoxifen blieben Effekte auf die Gonaden männlicher Embryonen aus, eine durch das potente Estrogen EE₂ hervorgerufene Feminisierung männlicher Gonaden konnte durch beide Substanzen jedoch effektiv antagonisiert werden. Weibchen bildeten unter Einfluss von Tamoxifen deutlich schmalere linke Gonaden mit einem missgebildeten Cortex aus. Weitere untersuchte Antiestrogene (Fulvestrant, Terbutryn und TBP) blieben ohne nennenswerte Effekte auf die gonadale

Geschlechtsdifferenzierung der Weibchen. Unter Einfluss der Androgene TBT und MT blieben Effekte auf männliche Embryonen aus. Bei den Weibchen führte die Androgen-Behandlung zu einer anatomischen Virilisierung der Gonaden, die den Eigenschaften eines sich entwickelnden Ovotestis ähnelten und einen reduzierten Cortex der linken Gonade aufwiesen. Bei weiteren Versuchen mit MT und Terbutryn blieben die zuvor gefundenen Effekte auf weibliche Embryonen aus, was vor allem in einem Unterschied hinsichtlich des eingesetzten Lösungsmittels der verschiedenen Versuche vermutet wird. Alleine die untersuchten antiandrogenen Versuchssubstanzen hatten keinen messbaren Effekt auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung männlicher und weiblicher Hühnerembryonen. Dies scheint mit dem Hormonsystem der Vögel in Zusammenhang zu stehen sowie der Tatsache, dass Androgene eine untergeordnete Rolle bei der Geschlechtsdifferenzierung der Vögel spielen. Es besteht zudem die Vermutung, dass die gonadenbezogenen Endpunkte kein geeignetes Zielgewebe für (Anti)androgene darstellen.

3. Die untersuchten gonadenbezogenen Endpunkte eignen sich für den Nachweis der Effekte ausgewählter endokriner Disruptoren auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos von *Gallus gallus domesticus*.

→ Diese Hypothese wird bedingt durch die eigenen Resultate unterstützt. Neben der Information über das genetische Geschlecht zeigen die gewählten Endpunkte Gonadenfläche, Cortexdicke und prozentualer Anteil der *Tubuli seminiferi* an, ob eine potentiell endokrine Prüfsubstanz in der Lage ist, die gonadale Geschlechtsdifferenzierung der Embryonen zu beeinflussen. Bei der Untersuchung der Effekte potentieller ED eignen sich vor allem solche Endpunkte, welche einer direkten oder indirekten Beeinflussung einer Substanz unterliegen, z.B. durch die substanzvermittelte Störung relevanter Stoffwechselwege oder Signalmoleküle. Hier bieten sich vor allem die Fortpflanzungsorgane inklusive der Gonaden an, da deren Entwicklung unter anderem von Hormonen und deren Rezeptoren abhängig ist. Endpunkte, die sich unmittelbar auf die Gonaden beziehen, scheinen bei der Untersuchung endokriner Verbindungen daher sinnvoll, da diese gezielt die Geschlechtsdifferenzierung beeinflussen. Es besteht jedoch immer die Möglichkeit, dass das Huhn nicht zu den Tierarten gehört, welche für eine bestimmte Verbindung empfänglich sind, so wie auch bei anderen häufig verwendeten Tierarten nachgewiesen wurde, dass sie nicht auf alle Chemikalien in ähnlicher Weise reagieren. So ist bekannt, dass es innerhalb der Klasse der Vögel unterschiedlich sensitive Spezies zu geben scheint. Während der Wachtelembryo beispielsweise besonders empfindlich auf estrogene ED mit Missbildungen der MD bzw. Ovidukte reagiert, scheint der

Hühnerembryo wenig empfindlich für diesen Endpunkt, und vergleichbare anatomische Fehlbildungen der MD sind deutlich schwächer ausgeprägt oder bleiben aus (*Berg et al., 2004, 2001, 1999; Mentor et al., 2020a, 2020b*). Es ist auch möglich, dass das Huhn empfindlicher auf eine Chemikalie reagiert als andere Tierarten. So ist bekannt, dass Hühner, einschließlich ihrer Embryonen, im Allgemeinen sensitiver auf viele untersuchte Giftstoffe reagieren als andere domestizierte oder wild lebenden Vogelarten (*Scanes & McNabb, 2003*).

Während die Behandlung bei mindestens einer der in der vorliegenden Arbeit untersuchten estrogenen, antiestrogenen und androgenen Versuchssubstanzen zu einer signifikanten Beeinflussung der Gonadendifferenzierung eines der beiden oder gar beider Geschlechter von *G. gallus domesticus* führte, hatten alleine die antiandrogenen Versuchssubstanzen keinen messbaren Effekt auf die untersuchten Endpunkte. Neben dem Vorhandensein spezifischer Hormonrezeptoren ist bei Vögeln vor allem die An- bzw. Abwesenheit von Estrogen ausschlaggebend für die Differenzierung in Richtung eines der beiden Geschlechter. Die native Anwesenheit von Estrogen bewirkt die Differenzierung zum weiblichen Geschlecht, die Abwesenheit von Estrogen dagegen die Differenzierung in Richtung des männlichen Geschlechts. So scheint es logisch, dass die Gonadenmorphologie der Hühnerembryonen einerseits durch exogene Estrogene wie EE₂ und BPA, andererseits aber auch durch Antiestrogene wie Tamoxifen, welche die gleichen Hormonrezeptoren, nämlich den ER, besetzen, nachhaltig beeinflussbar ist. Im Vergleich zu Estrogenen scheinen Androgene dagegen eine untergeordnete Rolle bei der Geschlechtsdifferenzierung von Vögeln zu spielen. Hier ist es vor allem das weibliche Geschlecht, das auf das Vorhandensein von Androgenen für die Differenzierung der weiblichen Gonaden angewiesen ist. So erscheint es logisch, dass unter Einfluss der Androgene TBT und MT ausschließlich die gonadale Differenzierung weiblicher Embryonen beeinflusst wurde. Während in der Gruppe der Androgene noch Effekte auf die Geschlechtsdifferenzierung weiblicher Embryonen festgestellt werden konnten, bleiben die Effekte von Antiandrogenen auf die Keimdrüsen bei beiden Geschlechtern aus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie eine Literaturrecherche legt die Vermutung nahe, dass die untersuchten gonadenbezogenen Endpunkte der Embryonen von *G. gallus domesticus* keine geeigneten Zielorgane bzw. -gewebe für (anti)androgene Substanzen darstellen. Sollen mit dem vorgestellten Testsystem in Zukunft auch (anti)androgene Substanzen erfolgreich untersucht werden, welche vergleichsweise wenig Hinweise auf eine adverse Beeinflussung der embryonalen Reproduktionsorgane geben als (anti)estrogene Verbindungen, müssen über die in der vorliegenden Dissertation diskutierten gonadenbezogenen Endpunkte hinaus möglicherweise weitere Endpunkte in Betracht gezogen werden. In der Literatur finden sich

verschiedene Hinweise und Empfehlungen für weitere sinnvolle Endpunkte zur Untersuchung (anti)androgener Substanzen. So wurden vor allem die inhibitorischen Effekte verschiedener (Anti)androgene auf die Entwicklung der Kloakaldrüse von Wachteln und der *Bursa fabricii* von Wachteln und Hühnern untersucht. Die *Bursa fabricii*, ein lymphatisches Organ von Vögeln, welches im Endbereich der Kloake lokalisiert ist, stellt aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Androgenen theoretisch ein Primärziel für androgenaktive ED dar (Quinn & Ottinger, 2006). Es ist bekannt, dass die In-ovo-Verabreichung von Testosteron das normale Wachstum und die Entwicklung der *Bursa fabricii* blockiert (Burke, 1996; Glick, 1983; Henry & Burke, 1999; Quinn & Ottinger, 2006). So zeigen verschiedene Studien an Wachtel und Huhn eine dosisbezogene Abnahme des Bursagewichts bei Exposition gegenüber Androgenen wie TP, TA und weiteren androgenen Substanzen (Burke, 1996; Glick, 1983; Quinn & Ottinger, 2006). Weitere Studien an der Wachtel zeigen, dass die in der Kloake befindliche, Schaum produzierende Kloakaldrüse (*Glandula proctodealis dorsalis*) (Quinn & Ottinger, 2006) ein weiteres Zielorgan für androgenaktive ED darstellt, da diese den AR enthält (Kaku et al., 1993), und ihr Wachstum durch zirkulierende Androgene reguliert wird (Balthazart et al., 1984; Kaku et al., 1993; Quinn & Ottinger, 2006; Yoshimura & Kawai, 2002). Das androgen wirksame TA führt in der Wachtel nicht nur zu einer Verzögerung der Pubertät und einer Reduktion des Reproduktionsverhaltens männlicher Tiere, sondern auch zu einer signifikanten Inhibierung der Entwicklung der Kloakaldrüse (Quinn & Ottinger, 2006; Quinn et al., 2007a). Auch die Studien von Utsumi and Yoshimura (2009) belegen, dass der empfindlichste Endpunkt androgener Wirkungen im Wachtelembryo die strukturellen Veränderungen in den Kloakaldrüsen sind. Für das Haushuhn liegen keine entsprechenden Hinweise vor, dass die Kloakaldrüse einen relevanten Endpunkt für die Untersuchung potentieller ED darstellt.

Zusammenfassend eignen sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten gonadenbezogenen Endpunkte bedingt für den Nachweis aller Arten von ED, da sich das Testsystem aufgrund des estrogenabhängigen Hormonsystems der Vögel vor allem für estrogene Substanzen eignet, seine Grenzen jedoch bei (anti)androgenen Substanzen findet. Ganz allgemein betrachtet, können die gonadenbezogenen Endpunkte als Biomarker für die Wirkung von ED beim Huhn jedoch sehr nützlich sein.

4. Histologische Untersuchungen der Gonaden lassen sich durch anatomische Marker ersetzen.

→ Diese Hypothese muss abgelehnt werden. Aus den dieser Dissertation zugrunde liegenden Daten lässt sich folgern, dass anatomische Endpunkte, wie die Gonadenfläche, schnelle

Ergebnisse in Bezug auf eine potentielle endokrine Beeinflussung der Keimdrüsen liefern können. Damit scheint der Endpunkt optimal geeignet für erste Substanzscreenings, da weit zeit- und arbeitsaufwändigere Verfahren, wie die histologische Aufarbeitung der Gonaden, theoretisch nicht erst vorgenommen werden müssen, um die endokrine Wirkung einer Substanz nachzuweisen. Während durch anatomische Endpunkte, wie die Gonadenfläche, bereits bei Sektion an E19 eingeordnet werden kann, ob eine Substanz ein endokrin disruptives Potential aufweist, erkennbar an einer deutlichen Zu- oder Abnahme der Gonadenfläche, so lässt dieser Endpunkt jedoch keine konkrete Aussage über die Art der Veränderung auf zellulärer Ebene zu. Ergänzend sollte deshalb stets eine histologische Gewebeuntersuchung durchgeführt werden, welche das durch anatomische Marker erzielte Ergebnis bestätigt und die substanzbedingten Veränderungen auf zellulärer Ebene offenlegt. Außerdem wird auf diesem Wege ausgeschlossen, dass Substanzen, die Effekte auf zellulärer, jedoch nicht auf anatomischer Ebene hervorrufen, verpasst werden. Es scheint, dass Veränderungen auf histologischer Ebene bereits bei deutlich kleineren Substanzkonzentrationen auftreten als auf anatomischer Ebene. So stellen *Shibuya et al. (2005)* bei Untersuchungen an der Wachtel fest, dass histopathologische Veränderungen der Gonaden bereits bei einer Dosis von 10 ppm E₂ zu beobachten sind, während (minimale) pathologische Veränderungen erst ab einer 10fach höheren Dosis auftreten. Auch *Mentor et al. (2020b)* finden Hinweise darauf, dass histologische Veränderungen bei niedrigeren Dosen auftreten als morphologische Veränderungen. So zeigen im Versuch mit BPA, BPAF und BPF-behandelten Hühnerembryonen alle Individuen mit einem anatomisch feststellbaren Ovotestis auch auf histologischer Ebene Anzeichen einer Feminisierung. Umgekehrt verzeichnen die Autoren jedoch eine Vielzahl von Embryonen, welche anatomisch unauffällige Hoden aufweisen, in der nachfolgenden histologischen Gewebeaufarbeitung jedoch leichte zelluläre Veränderungen zeigten. Diese Ergebnisse bestätigen auch eigene Untersuchungen, in denen substanzbedingte histologische Veränderungen bei deutlich geringeren Substanzdosen nachgewiesen werden können als für anatomische Endpunkte. So verursacht beispielsweise eine Dosis von 75 µg BPA/g Ei bei männlichen Hühnerembryonen bereits eine ovarähnliche Verdickung der Cortexregion des linken Hodens, während Dosen bis zu 300 µg BPA/g Ei verglichen mit der Kontrollgruppe zu keinem signifikanten Unterschied in der Gonadenfläche führen (*Jessl et al., 2018a*). Auch im Experiment mit Tamoxifen sind bereits ab einer Dosis von 0,1 µg/g Ei histologische Effekte in Form eines signifikant schmaleren weiblichen linken Cortex messbar, während der anatomische Endpunkt Gonadenfläche erst ab einer Konzentration von 10 µg/g Ei signifikant von der Kontrolle abweicht (*Jessl et al., 2018b*). Zusammengefasst legt dies nahe, dass

substanzbedingte Veränderungen der Fortpflanzungsorgane durch histologische Endpunkte deutlich sensitiver nachzuweisen sind als morphologische Endpunkte. Nach *Temple et al. (2020)* stellen pathologische Veränderungen lediglich einen Hinweis und keine Diagnose für eine endokrine Wechselwirkung dar, da diese auch Ergebnis einer systemischen Toxizität sein können. In diesem Zusammenhang ist es von großer Wichtigkeit, auf einen gut untermauerten Datensatz an Kontrollen zurückgreifen zu können, um natürlich auftretende Effekte von substanzbedingten Effekten unterscheidbar zu machen. Die Studie von *Temple et al. (2020)* legt nahe, dass anatomische Endpunkte nicht ohne weitere aussagekräftige Endpunkte betrachtet werden sollten, und führt die Empfehlung der *ECHA/EFSA (2018)* an, die Ergebnisse pathologischer Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung endokriner Zielorgane, wie den Reproduktionsorganen, einschließlich den Keimdrüsen, anzugeben. Auf eine tiefergehende histologische Untersuchung sollte daher zusammenfassend nicht verzichtet werden, sondern diese zur Untermauerung vorausgegangener anatomischer Ergebnisse hinzugezogen werden und eine deutlich feinere Analyse der auf zellulärer Ebene existierenden Effekte zu ermöglichen.

5. Der Embryo von *Gallus gallus domesticus* eignet sich als alternatives Versuchssystem zur Untersuchung und zum Nachweis der Effekte ausgewählter endokriner Disruptoren.

→ Diese Hypothese wird durch die eigenen Resultate unterstützt. Das in der vorliegenden Dissertation vorgestellte, auf dem Hühnerembryo basierende Testsystem eignet sich in besonderer Weise zur Detektion möglicher endokriner Potentiale einer Substanz. Wie gezeigt, reagiert der Hühnerembryo mit Veränderungen der gonadalen Geschlechtsdifferenzierung sowie allgemeiner physiologischer Parameter hinreichend sensitiv auf die In-ovo-Applikation verschiedener endokrin disruptiver Versuchssubstanzen. Die Vor- und Nachteile des Testsystems werden an dieser Stelle nochmals hervorgehoben und mit bereits etablierten Testsystemen verglichen.

Der Einsatz des Vogelembryos im Allgemeinen hat eine Fülle von Vorteilen gegenüber bereits etablierten Testsystemen zur Untersuchung der Effekte von Chemikalien auf die Differenzierung eines Organismus. Bei vielen der bereits lange in Verwendung befindlichen Testsysteme, wie dem nagerbasierten uterotrophen Assay (TG 440; *OECD, 2007b*) oder dem Hershberger Assay (*OECD TG 441; OECD, 2009*), ist als besonders kritisch zu betrachten, dass diese das für endokrin wirksame Substanzen empfindlichste Lebensstadium, nämlich den sich entwickelnden Embryo, nicht weiter berücksichtigen (*Cook et al., 1997; Grote et al., 2004; Lan & Katzenellenbogen, 1976*). Dabei konnten diverse toxikologische Studien bereits belegen,

dass die Embryonalphase eines Organismus deutlich sensitiver auf Störsubstanzen reagiert als Organismen in der Adultphase. Während der Entwicklung eines Organismus gibt es immer wieder kritische Zeitfenster, in denen die Differenzierung und Organisation spezifischer Organe und Gewebe stattfindet. So kann eine durch ED hervorgerufene Beeinträchtigung der endokrinen Signalübertragung während der embryonalen Geschlechtsdifferenzierung die Struktur und Funktion des reproduktiven endokrinen Systems irreversibel verändern. Beim Vogelembryo ist dies darauf zurückzuführen, dass die gonadale Geschlechtsdifferenzierung von einem definierten Gehalt an Steroidhormonen in den frühen Entwicklungsstadien abhängig ist (Marlatt *et al.*, 2022). Verglichen mit anderen domestizierten oder wildlebenden Vogelarten reagieren speziell Hühner einschließlich ihrer Embryonen häufig am empfindlichsten auf viele Giftstoffe (Scanes & McNabb, 2003), was ihren Nutzen für das in der vorliegenden Dissertation vorgestellte Testsystem untermauert. Da bekannt ist, dass der Einfluss von Xenohormonen in sich entwickelnden Vogelembryonen zu irreversiblen Missbildungen der Geschlechtsorgane oder nach Schlupf zu einem gestörten geschlechtsbezogenen Verhalten führen kann, während ED weniger starke und häufig reversible Effekte in der Adultphase der Tiere auslösen (Adkins-Regan, 1990; Ottinger & Abdelnabi, 1997), eignet sich der Vogelembryo in besonderer Weise für die Untersuchung der frühen Geschlechtsentwicklung und der möglichen Einflüsse von ED.

Weitere nagerbasierte Tests, wie der pränatale Entwicklungstoxizitätstest (OECD TG 414; OECD, 2018a), der Reproduktions-/Entwicklungstoxizitätstest (OECD TG 421; OECD, 2016) und der kombinierte Toxizitätstest bei wiederholter Verabreichung mit Reproduktions-/Entwicklungstoxizitätstest (OECD TG 422; OECD, 2015a), der erweiterte Ein-Generation Reproduktionstoxizitätstest (OECD TG 443; OECD, 2018b) und der Zwei-Generationen Reproduktionstoxizitätstest (OECD TG 416; OECD, 2001) schließen die oben genannte Lücke weitgehend, indem nicht nur die eingesetzten Elterntiere, sondern auch deren Nachkommen auf durch chemische Exposition verursachte Änderungen unter anderem der Geschlechtsorgane untersucht werden. Anders als bei Säugetieren oder aquatischen Organismen entwickelt sich der Vogel- bzw. Hühnerembryo in einem weitgehend abgeschlossenen System, welches über den Austausch von Gasen hinaus kaum in Wechselwirkung mit seiner Umwelt steht. Dies beinhaltet auch die vom Muttertier unabhängige Entwicklung des Embryos (De Groef *et al.*, 2008), was zur Folge hat, dass der Embryo nach der Eiablage weder von deren Hormonsystem beeinflusst wird, noch dass Elterntiere getötet werden müssen, um den Embryo in einer frühen, pränatalen Phase untersuchen zu können. Beim Vogeleitest muss jedoch auch genannt werden, dass das Testsystem nicht vollständig auf den Einsatz von Tieren verzichten kann. Vielmehr stellen In-ovo-Modelle einen Mittelweg zwischen In-vitro- und In-vivo-Assays dar. Da sie

immer noch einen ganzen, wenn auch nicht voll entwickelten biologischen Organismus erfordern, wirken sie sich in Bezug auf die von *Russell & Burch (1959)* definierten 3R vor allem auf die Komponente „verfeinern“ und „reduzieren“ aus, anstatt einen Organismus vollständig zu „ersetzen“ (*Ball & Lavado, 2021*). Aus juristischer Sicht stellten Versuche mit dem Hühnerembryo in der Vergangenheit eine relevante Alternative zu gängigen vertebratenbasierten Testsystemen dar, da er bis zum Jahr 2021 nach deutschem Recht bis kurz vor Schlupf nicht unter das Tierschutzgesetz fiel und daher im weitesten Sinne als In-vitro-System betrachtet werden konnte. Nach neuester Gesetzgebung und Aktualisierung des Tierschutzgesetzes ist ein Brutabbruch nach Tag 6 der Embryonalentwicklung seit dem Jahr 2022 nicht mehr zulässig, wobei der Einsatz von Haushühnküken der Art *G. gallus* inklusive ihrer Gewebe und Organe zur Verwendung im Tierversuch oder für wissenschaftliche Zwecke ausgenommen ist (*Bundesministerium der Justiz, 2022*).

Ein bedeutender Vorteil bei der Chemikaliientestung *in ovo* ist die Applikation von Substanzen direkt in das Ei, was spezifische und standardisierte Dosierungen ermöglicht und einen relevanten Pfad, nämlich den mütterlichen Transfer von Giftstoffen in den Eidotter darstellt. Außerdem ist die Injektion in den Eidotter ein ökotoxikologisch relevanter Weg für die Exposition gegenüber lipophilen Umweltschadstoffen, der einen direkten Vergleich mit den in Eiern von Wildvögeln gefundenen Konzentrationen ermöglicht (*Berg et al., 2001, 1999*). Da unmittelbar nach Applikation kein Austausch oder Verlust von Versuchssubstanz mehr möglich ist, resultiert diese Technik in einer chronischen Exposition des Embryos, die ausreichend ist, um dessen Entwicklung signifikant zu beeinflussen. Da es sich um ein weitgehend geschlossenes System handelt, in dem die Chemikalie während der gesamten Entwicklung in direktem Kontakt mit dem Embryo steht, ist es wahrscheinlich, dass jede toxische oder teratogene Wirkung leicht zu beobachten sein wird. Die Untersuchung potentieller Auswirkungen von ED auf den Hühnerembryo wird zudem dadurch erleichtert, dass dessen Normalentwicklung bereits vollständig beschrieben (*Hamburger & Hamilton, 1992; Keibel & Abraham, 1900; Starck & Ricklefs, 1997*) und die einzelnen Entwicklungsstadien leicht zugänglich und gut einsehbar sind. So kann die Entwicklung des Embryos über die gesamte Bebrütungsphase hinweg mittels Schieren (Durchleuchten) der Eier relativ einfach verfolgt werden.

Über die genannten nagerbasierten Tests hinaus werden die kritischen Effekte von ED auf die Geschlechtsdifferenzierung in höheren Vertebraten mit einem Multigenerationstest an Wachteln und weiteren Vogelarten untersucht (OECD TG 206 und USEPA TG 890.2100;

OECD, 1984; USEPA, 2015). Neben dem hohen zeitlichen, personellen und finanziellen Aufwand wird eine große Zahl an Versuchstieren für diese Tests benötigt. Mit dem vorgestellten Testsystem auf Grundlage des Hühnerembryos entfallen die Tierhaltung und die damit verbundenen Nachteile weitestgehend, da die Inkubation der Eier in Temperatur- und Luftfeuchte-regulierten Bebrütern relativ einfach, platzsparend und kostengünstig zu realisieren ist. Durch die vergleichsweise kurze Versuchsdauer von nur 19 Tagen ist ein schnelles Substanzscreening möglich, welches zeitlich deutliche Vorteile gegenüber den etablierten vogelbasierten Testsystemen hat.

Da das Hormonsystem der Vögel weitgehend mit dem der Säugetiere vergleichbar ist (*Lange et al., 2002; Ritchie & Pilny, 2008*), lassen sich die Ergebnisse des Hühnereitests im Sinne der Gefahren- und Risikobewertung zumindest teilweise auf den Säuger, inklusive den Menschen, übertragen. Aber auch eine ökotoxikologische Risikobewertung ist mit dem Testsystem Hühnerei möglich. Es liegt auf der Hand, dass die oben genannten Vorteile des Testsystems bei Weitem dessen Nachteile überwiegen. Als Alternative zu bisherigen Assays könnte der vorgeschlagene Hühnereitest dazu beitragen, künftig weniger Versuchstiere zu konsumieren.

3 FAZIT UND AUSBLICK

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer auf dem Hühnerembryo basierenden Alternativmethode zu den bisher etablierten nagerbasierten Testsystemen für die Untersuchung der Effekte hormonell aktiver Substanzen auf die Geschlechtsdifferenzierung in höheren Wirbeltieren. Mit den in diesem Rahmen durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Embryo von *G. gallus domesticus* einen sensitiven Organismus innerhalb des Tierreichs darstellt und hinreichend sensitiv auf eine Reihe von endokrin wirksamen und reproduktionstoxisch wirkenden Chemikalien reagiert. Der Hühnereitest ist eine sinnvolle Ergänzung zur bestehenden OECD-Testbatterie und zeichnet sich besonders durch seine kostengünstige und einfache Handhabung im Labor sowie einfach durchzuführende Tests aus. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation verdeutlichen, wie wichtig es ist, die Embryonalphasen von Organismen in die Betrachtung der Effekte von Umweltchemikalien miteinzubeziehen. Anatomische und histologische Änderungen der Gonaden können daher als Biomarker für die Wirkung von ED bei Vögeln nützlich sein.

Die untersuchten Endpunkte Mortalität, Missbildungsrate und Körperlänge eignen sich zum Nachweis der toxischen Potentialen endokriner Substanzen. So kann beispielsweise eine substanzbedingte Entwicklungsverzögerung, erkennbar an einem embryonalen Minderwuchs, wie im Versuch mit dem antiandrogenen CPA gezeigt, nachgewiesen werden. Bei den untersuchten gonadenbezogenen Endpunkten eignet sich besonders der anatomische Endpunkt Gonadenfläche für ein Schnellscreening von Substanzen, wobei die histologischen Endpunkte Cortexdicke und Anteil an *Tubuli seminiferi* stets zur Untermauerung und Verfeinerung der gefundenen Ergebnisse herangezogen werden sollten. Die beiden histologischen Endpunkte stellen sich insgesamt als sensitivste Marker heraus, da mit ihnen bereits bei Einsatz geringer Substanzdosen Effekte auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung des Hühnerembryos nachgewiesen werden können. Unter Estrogeneinfluss entwickelten sich die Keimdrüsen der Männchen zu Ootestes, welche in Größe und Form dem weiblichen Ovar gleichen und histologisch einen Cortex sowie zum Teil *Lacunae* und einen Rückgang des Anteils an *Tubuli seminiferi* aufwiesen. Weibliche Embryonen entwickelten unter Estrogeneinfluss ein Ovar mit deutlich schmalere Cortex. Bei Behandlung mit Antiestrogenen blieben Effekte auf die Gonaden männlicher Embryonen aus, eine durch das potente Estrogen EE₂ hervorgerufene Feminisierung männlicher Gonaden konnte durch beide Substanzen jedoch effektiv antagonisiert werden. Weibchen bildeten unter Einfluss von Tamoxifen deutlich schmalere linke Gonaden mit einem missgebildeten Cortex aus. Unter Einfluss der Androgene TBT und MT

blieben die Effekte auf männliche Embryonen aus. Bei den Weibchen führte die Androgen-Behandlung zu einer anatomischen Virilisierung der Gonaden, die den Eigenschaften eines sich entwickelnden Ovotestis ähnelten und einen reduzierten Cortex der linken Gonade aufwiesen. Alleine die untersuchten antiandrogenen Versuchssubstanzen hatten keinen Effekt auf die gonadale Geschlechtsdifferenzierung männlicher und weiblicher Hühnerembryonen. Dies scheint angesichts der Tatsache, dass Androgene eine untergeordnete Rolle bei der Geschlechtsdifferenzierung von Vögeln spielen und die untersuchten gonadenbezogenen Endpunkte möglicherweise keine Zielgewebe für (anti)androgene Substanzen darstellen, plausibel.

Bis zur Reife des Tests ist jedoch noch zusätzlicher Arbeitsaufwand nötig. So sollte die Untersuchung weiterer anatomischer oder histologischer Endpunkte, welche die Effekte (anti)androgener Substanzen nachweisbar machen und Zielgewebe für diese Substanzen darstellen, bevorzugt aufgegriffen werden. Ebenfalls interessant wäre die Einführung einer weiteren Kontrollgruppe, welche eine ähnliche Behandlung unterläuft wie die Lösemittelkontrolle, d.h. Einführen einer Spritze in den Eidotter, jedoch ohne Substanzapplikation. Damit könnte schärfer abgegrenzt werden, ob ein in der Lösemittelkontrolle auftretender Effekt durch die Manipulation der Eier oder durch das Lösemittel bedingt ist. Im Rahmen der 3R sollte außerdem versucht werden, eine weitere Optimierung des Systems herbeizuführen und in Zusammenhang mit molekularbiologischen Untersuchungen eine Möglichkeit gefunden werden, den Hühnerembryo in früheren Entwicklungsphasen untersuchbar zu machen.

4 LITERATUR

- Abdulateef, S. M., Majid, A. A., Al-Bayer, M. A., Shawkat, S. S., Tatar, A., Mohammed, T. T., Abdulateef, F. M., & Al-Ani, M. Q. (2021): Effect of aromatase inhibitors on sex differentiation and embryonic development in chicks. *Veterinary Medicine and Science*, 7(6), 2362-2373.
- Adkins-Regan, E. (1990): Hormonal basis of sexual differentiation in birds. *Hormones, brain and behavior in vertebrates* 8: 1-14. Basel: Karger.
- Adkins-Regan, E., & Garcia, M. (1986): Effect of flutamide (an antiandrogen) and diethylstilbestrol on the reproductive-behavior of Japanese quail. *Physiology & Behavior*, 36(3), 419-425.
- Aktas, A., Ulkay, M. B., & Bozkurt, H. H. (2008): The effects of genistein on the cockerel testis during embryonic development. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 14(2), 157-160.
- Alsop, F. M. (1919): The effect of abnormal temperatures upon the developing nervous system in the chick embryos. *Anatomical Record*, 15(6), 306-331.
- Anderson, G. L., Cole, R. D., & Williams, P. L. (2004): Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), 1235-1240.
- Andrews, J. E., Smith, C. A., & Sinclair, A. H. (1997): Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *General and Comparative Endocrinology*, 108(2), 182-190.
- Ayers, K. L., Davidson, N. M., Demiyah, D., Roeszler, K. N., Grutzner, F., Sinclair, A. H., Oshlack, A., & Smith, C. A. (2013): RNA sequencing reveals sexually dimorphic gene expression before gonadal differentiation in chicken and allows comprehensive annotation of the W-chromosome. *Genome Biology*, 14(3).
- Ayers, K. L., Lambeth, L. S., Davidson, N. M., Sinclair, A. H., Oshlack, A., & Smith, C. A. (2016): Identification of candidate gonadal sex differentiation genes in the chicken embryo using RNA-seq. *BMC Genomics*, 17(169).
- Ayers, K. L., Sinclair, A. H., & Smith, C. A. (2013): The molecular genetics of ovarian differentiation in the avian model. *Sexual Development*, 7(1-3), 80-94.
- Ball, A. L., & Lavado, R. (2021): Ecotoxicology assessments in avian species using cell-based models: A review. *Avian Biology Research*, 14(4), 105-112.
- Balthazart, J., Schumacher, M., & Malacarne, G. (1984): Relative potencies of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone on crowing and cloacal gland growth in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Endocrinology*, 100(1), 19-23.
- Bellott, D. W., & Page, D. C. (2021): Dosage-sensitive functions in embryonic development drove the survival of genes on sex-specific chromosomes in snakes, birds, and mammals. *Genome Research*, 31(2).
- Bellott, D. W., Skaletsky, H., Cho, T. J., Brown, L., Locke, D., Chen, N., Galkina, S., Pyntikova, T., Koutseva, N., Graves, T., Kremitzki, C., Warren, W. C., Clark, A. G., Gaginskaya, E., Wilson, R. K., & Page, D. C. (2017): Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. *Nature Genetics*, 49(3), 387-394.
- Bellott, D. W., Skaletsky, H., Pyntikova, T., Mardis, E. R., Graves, T., Kremitzki, C., Brown, L. G., Rozen, S., Warren, W. C., Wilson, R. K., & Page, D. C. (2010): Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition. *Nature*, 466(7306), 612-613.
- Bentrem, D. J., Dardes, R. C., Liu, H., Maccgregor-Schafer, J., Zapf, J. W., & Jordan, V. C. (2001): Molecular mechanism of action at estrogen receptor α of a new clinically relevant antiestrogen (GW7604) related to tamoxifen. *Endocrinology*, 142(2), 838-846.
- Berg, C., Blomqvist, A., Holm, L., Brandt, I., Brunstrom, B., & Ridderstrale, Y. (2004): Embryonic exposure to oestrogen causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Reproduction*, 128(4), 455-461.
- Berg, C., Halldin, K., & Brunstrom, B. (2001): Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(12), 2836-2840.
- Berg, C., Halldin, K., Brunstrom, B., & Brandt, I. (1998): Methods for studying xenoestrogenic effects in birds. *Toxicology Letters*, 103, 671-676.

- Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, A. K., Brandt, I., & Brunstrom, B. (1999): The avian egg as a test system for endocrine disrupters: Effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Science of the Total Environment*, 233(1-3), 57-66.
- Berg, C., Holm, L., Brandt, I., & Brunstrom, B. (2001): Anatomical and histological changes in the oviducts of Japanese quail, *Coturnix japonica*, after embryonic exposure to ethynylestradiol. *Reproduction*, 121(1), 155-165.
- Berge, J. A., Brevik, E. M., Bjorge, A., Folsvik, N., Gabrielsen, G. W., & Wolkers, H. (2004): Organotins in marine mammals and seabirds from Norwegian territory. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(2), 108-112.
- Bernardo, A. D., Heeren, A. M., van Iperen, L., Fernandes, M. G., He, N. N., Anjie, S., Noce, T., Ramos, E. S., & Lopes, S. (2015): Meiotic wave adds extra asymmetry to the development of female chicken gonads. *Molecular Reproduction and Development*, 82(10), 774-786.
- Blair, R. M., Fang, H., Branham, W. S., Hass, B. S., Dial, S. L., Moland, C. L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., & Sheehan, D. M. (2000): The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences*, 54(1), 138-153.
- Blomqvist, A., Berg, C., Holm, L., Brandt, I., Ridderstrale, Y., & Brunstrom, B. (2006): Defective reproductive organ morphology and function in domestic rooster embryonically exposed to *o,p'*-DDT or ethynylestradiol. *Biology of Reproduction*, 74(3), 481-486.
- Bruggeman, V., Van As, P., & Decuypère, E. (2002): Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 131(4), 839-846.
- Brunstrom, B., Axelsson, J., & Halldin, K. (2003): Effects of endocrine modulators on sex differentiation in birds. *Ecotoxicology*, 12(1-4), 287-295.
- Brunstrom, B., Axelsson, J., Mattsson, A., & Halldin, K. (2009): Effects of estrogens on sex differentiation in Japanese quail and chicken. *General and Comparative Endocrinology*, 163(1-2), 97-103.
- Brunstrom, B., & Halldin, K. (2000): Ecotoxicological risk assessment of environmental pollutants in the Arctic. *Toxicology Letters*, 112-113, 111-118.
- Bundesministerium der Justiz. (2022): Tierschutzgesetz, §4c der Aktualisierung vom 18.06.2021. Abgerufen von: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>. Abrufdatum: 08.06.2023.
- Burke, W. H. (1996): Effects of an *in ovo* injection of an anti-androgen on embryonic and posthatching growth of broiler chicks. *Poultry Science*, 75(5), 648-655.
- Burke, W. H., & Henry, M. H. (1999): Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. *Poultry Science*, 78(7), 1019-1033.
- Busby, W. F., Ackermann, J. M., & Crespi, C. L. (1999): Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on *in vitro* activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition*, 27(2), 246-249.
- Byerly, T. C. (1930): The effects of breed on the growth of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 50(2), 341-359.
- Carew, L. B., & Foss, D. C. (1972): Tolerance of chicks for dimethyl sulfoxide. *Poultry Science*, 51(1), 206-211.
- Carlson, N., & Stahl, A. (1985): Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, 74(1), 52-59.
- Carlson, N., & Stahl, A. (1973): Morphogenesis of sexual cords and significance of medullary zone of gonad in chicken embryo. *Acta Anatomica*, 85(2), 248-274.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., & Skakkebaek, N. E. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*, 305(6854), 609-613.
- Carson, R. (1962): *Silent Spring*. Houghton Mifflin, New York.
- CAS. (2023): Substance collection. Abgerufen von: <https://www.cas.org/cas-data/cas-registry>. Abrufdatum: 08.06.2023.
- Caujolle, F. M., Caujolle, D. H., Cros, S. B., & Calvet, M. M. J. (1967): Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141(A1), 110-126.

- Chataigneau, T., Zerr, M., Chataigneau, M., Hudlett, F., Hirn, C., Pernot, F., & Schini-Kerth, V. B. (2004): Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats. *Menopause*, 11(3), 255-263.
- Chauret, N., Gauthier, A., & Nicoll-Griffith, D. A. (1998): Effect of common organic solvents on *in vitro* cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 26(1), 1-4.
- Chen, T.-H., Wang, Y.-H., & Wu, Y.-H. (2011): Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquatic Toxicology*, 102(3-4), 162-166.
- Chue, J., & Smith, C. A. (2011): Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS Journal*, 278(7), 1027-1034.
- Coco, C. M., Hargis, B. M., & Hargis, P. S. (1992): Effect of *in ovo* 17 β -estradiol or tamoxifen administration on sexual-differentiation of the external genitalia. *Poultry Science*, 71(11), 1947-1951.
- Cook, J. C., Kaplan, A. M., Davis, L. G., & Oconnor, J. C. (1997): Development of a tier I screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 26(1), 60-68.
- De Groef, B., Grommen, S. V. H., & Darras, V. M. (2008): The chicken embryo as a model for developmental endocrinology: Development of the thyrotropic, corticotropic, and somatotropic axes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 293(1-2), 17-24.
- Demissie, M., Lazic, M., Foecking, E. M., Aird, F., Dunaif, A., & Levine, J. E. (2008): Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(2), E262-268.
- DeWitt, J. C., Meyer, E. B., & Henshel, D. S. (2005a): Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: Effects of injection day. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2), 270-277.
- DeWitt, J. C., Meyer, E. B., & Henshel, D. S. (2005b): Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: Effects of vehicle volume. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2), 260-269.
- Easterbrook, J., Lu, C., Sakai, Y., & Li, A. P. (2001): Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(2), 141-144.
- ECHA. (2023): Endocrine disruptor assessment list. Abgerufen von: <https://echa.europa.eu/de/ed-assessment-/dislist/details/0b0226e185545702>. Abrufdatum: 08.06.2023.
- ECHA. (2023a): Informationen über Chemikalien, Datenbank des C&L-Verzeichnisses. Abgerufen von: https://echa.europa.eu/de/information-on-chemicals/cl-inventory-database?p_p_id=dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_jspPage=%2Fhtml%2Fsearch%2Fsearch.jsp&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_searching=true&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_iterating=true&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_criteriaParam=_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_criteriaKeyEODY&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_delta=50&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_orderByCol=CLD_NAME&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_orderByType=asc&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_resetCur=false&_dissclinventory_WAR_dissclinventoryportlet_cur=1. Abrufdatum: 08.06.2023.
- ECHA. (2023b): Tierversuche im Rahmen von REACH. Abgerufen von: <https://echa.europa.eu/animal-testing-under-REACH>. Abrufdatum: 08.06.2023.
- ECHA/EFSA. (2018): Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. *EFSA Journal*, 16(6), e05311.
- Eising, C. M., Eikenaar, C., Schwbl, H., & Groothuis, T. G. G. (2001): Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: Consequences for chick development. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1469), 839-846.
- Elbrecht, A., & Smith, R. G. (1992): Aromatase enzyme-activity and sex determination in chickens. *Science*, 255(5043), 467-470.

- Eldefrawy, F., Xu, H. S., Pusch, E., Karkoura, A., Alsafy, M., Elgendy, S., Williams, S. M., Navara, K., & Guo, T. L. (2021): Modulation of folliculogenesis in adult laying chickens by bisphenol A and bisphenol S: Perspectives on ovarian morphology and gene expression. *Reproductive Toxicology*, 103, 181-190.
- Ellis, H. L., Shioda, K., Rosenthal, N. F., Coser, K. R., & Shioda, T. (2012): Masculine epigenetic sex marks of the CYP19A1/aromatase promoter in genetically male chicken embryonic gonads are resistant to estrogen-induced phenotypic sex conversion. *Biology of Reproduction*, 87(1).
- Esener, O. B. B., & Bozkurt, H. H. (2018): Effects of *in ovo* injected bisphenol A on the testis of one day old chickens. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 65(1), 21-28.
- Estermann, M. A., Major, A. T., & Smith, C. A. (2021): Genetic regulation of avian testis development. *Genes*, 12(9).
- Etches, R., & Kagami, H. (1997): Genotypic and phenotypic sex reversal. In: Harvey, S., Etches, R.J., (eds.). *Perspectives in Avian Endocrinology*. Journal of Endocrinology Ltd., Bristol, 57-67.
- Europäisches Parlament. (2006): Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH).
- Europäisches Parlament. (2010): Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.
- European Commission. (2016): Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on endocrine disruptors and the draft Commission acts setting out scientific criteria for their determination in the context of the EU legislation on plant protection products and biocidal products. COM(2016)350.
- Ezaz, T., Stiglec, R., Veyrunes, F., & Graves, J. A. M. (2006): Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology*, 16(17), R736-R743.
- Farhat, A., Crump, D., Bidinosti, L., Boulanger, E., Basu, N., Hecker, M., & Head, J. A. (2020): An early-life stage alternative testing strategy for assessing the impacts of environmental chemicals in birds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(1), 141-154.
- Fazli, N., Hassanabadi, A., Mottaghitalab, M., & Hajati, H. (2015): Manipulation of broiler chickens sex differentiation by *in ovo* injection of aromatase inhibitors, and garlic and tomato extracts. *Poultry Science*, 94(11), 2778-2783.
- Fennell, M. J., Radecki, S. V., Proudman, J. A., & Scanes, C. G. (1996): The suppressive effects of testosterone on growth in young chickens appears to be mediated via a peripheral androgen receptor; Studies of the anti-androgen ICI 176,334. *Poultry Science*, 75(6), 763-766.
- Fent, K. (2013): *Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie*. (Vol. 4/4th edition). Thieme Verlag, Stuttgart.
- Fridolfsson, A. K., Cheng, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Liu, H. C., Raudsepp, T., Woodage, T., Chowdhary, B., Halverson, J., & Ellegren, H. (1998): Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8147-8152.
- Fry, D. M. (1995): Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial-chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 103, 165-171.
- Fry, D. M., & Toone, C. K. (1981): DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*, 213(4510), 922-924.
- Furuya, M., Adachi, K., Kuwahara, S., Ogawa, K., & Tsukamoto, Y. (2006): Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by bisphenol-A. *Life Sciences*, 78(15), 1767-1776.
- Furuya, M., Sasaki, F., Hassanin, A. M. A., Kuwahara, S., & Tsukamoto, Y. (2003): Effects of bisphenol-A on the growth of comb and testes of male chicken. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67(1), 68-71.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014): Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB Journal*, 28(3), 1317-1330.
- Gao, H., Yang, B. J., Li, N., Feng, L. M., Shi, X. Y., Zhao, W. H., & Liu, S. J. (2015): Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. *Medicine*, 94(1).
- Gasc, J. M. (1980): Estrogen target-cells in gonads of the chicken-embryo during sexual-differentiation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 55, 331-342.

- Ginsburg, M., & Eyalgiladi, H. (1987): Primordial germ-cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development*, 101(2), 209-219.
- Glick, B. (1983): *Bursa of Fabricius* (Vol. 8). Academic Press, New York.
- Gong, A., Freking, F. W., Wingfield, J., Schlinger, B. A., & Arnold, A. P. (1999): Effects of embryonic treatment with fadrozole on phenotype of gonads, syrinx, and neural song system in zebra finches. *General and Comparative Endocrinology*, 115(3), 346-353.
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015): EDC-2: The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), E1-E150.
- Greenwood, A. W., & Blyth, J. S. S. (1938): Experimental modification of the accessory sexual apparatus in the hen. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, 28, 61-69.
- Grisham, W., Park, S. H., Hsia, J. K., Kim, C., Leung, M. C., Kim, L., & Arnold, A. P. (2007): Effects of long-term flutamide treatment during development in zebra finches. *Neuroscience Letters*, 418(1), 92-96.
- Groenendijk-Huijbers, M., & Van Schaik, J. (1976): Effects of hemicastration, testis implantation and administration of testosterone propionate on the female embryonic genital tract in various breeds and strains of chickens. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*, 179-182.
- Grote, K., Stahlschmidt, B., Talsness, C. E., Gericke, C., Appel, K. E., & Chahoud, I. (2004): Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology*, 202(3), 145-158.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R. (1990): A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346(6281), 245-250.
- Guioli, S., & Lovell-Badge, R. (2007): PITX2 controls asymmetric gonadal development in both sexes of the chick and can rescue the degeneration of the right ovary. *Development*, 134(23), 4199-4208.
- Guioli, S., Nandi, S., Zhao, D. B., Burgess-Shannon, J., Lovell-Badge, R., & Clinton, M. (2014): Gonadal asymmetry and sex determination in birds. *Sexual Development*, 8(5), 227-242.
- Gurney, M. E., & Konishi, M. (1980): Hormone-induces sexual-differentiation of brain and behavior in zebra finches. *Science*, 208(4450), 1380-1383.
- Ha, Y. J., Tsukada, A., Saito, N., & Shimada, K. (2004): Changes in mRNA expression of MMP-2 in the Mullerian duct of chicken embryo. *General and Comparative Endocrinology*, 139(2), 131-136.
- Halldin, K., Berg, C., Bergman, A., Brandt, I., & Brunstrom, B. (2001): Distribution of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in quail eggs, embryos and laying birds and studies on reproduction variables in adults following *in ovo* exposure. *Archives of Toxicology*, 75(10), 597-603.
- Halldin, K., Holm, L., Ridderstrale, Y., & Brunstrom, B. (2003): Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix japonica*) after *in ovo* exposure to *o,p'*-DDT. *Archives of Toxicology*, 77(2), 116-122.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992): A series of normal stages in the development of the chick-embryo (reprinted from *Journal of Morphology*, Vol. 88, 1951). *Developmental Dynamics*, 195(4), 231-272.
- Hanafy, A. M., Sasanami, T., Ichikawa, K., Shimada, K., & Mori, M. (2004): Estrogen receptor binding of xenoestrogens and phytoestrogens in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *The Journal of Poultry Science*, 41(1), 30-37.
- Hanafy, A. M., Sasanami, T., & Mori, M. (2005): Binding of xenoestrogens and phytoestrogens to estrogen receptor β of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *The Journal of Poultry Science*, 42(3), 238-244.
- Handley, L. L., Ceplitis, H., & Ellegren, H. (2004): Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: Implications for sex chromosome evolution. *Genetics*, 167(1), 367-376.
- Hartung, T., & Rovida, C. (2009): Chemical regulators have overreached. *Nature*, 460(7259), 1080-1081.
- Henry, M. H., & Burke, W. H. (1999): The effects of *in ovo* administration of testosterone or an antiandrogen on growth of chick embryos and embryonic muscle characteristics. *Poultry Science*, 78(7), 1006-1013.
- Henry, P. F. P., Akuffo, V. G., Chen, Y., Karouna-Renier, N. K., Sprague, D. T., & Bakst, M. R. (2012): Effect of 17 β -trenbolone on male and female reproduction in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Avian Biology Research*, 5(2), 61-68.

- Herbst, A. L., Ulfelder, H., & Poskanzer, D. C. (1971): Adenocarcinoma of the vagina - Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England Journal of Medicine*, 284(16), 878-881.
- Hertel, P., Kramer, M., & Neumann, F. (1969): Influence of an antiandrogen (cyproterone acetate) on bone growth and bone maturation in male rats. *Arzneimittel-Forschung*, 19(11), 1777-1790.
- Hickey, J. J., & Anderson, D. W. (1968): Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science*, 162(3850), 271-273.
- Hickman, D., Wang, J. P., Wang, Y., & Unadkat, J. D. (1998): Evaluation of the selectivity of *in vitro* probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metabolism and Disposition*, 26(3), 207-215.
- Hirst, C. E., Major, A. T., Ayers, K. L., Brown, R. J., Mariette, M., Sackton, T. B., & Smith, C. A. (2017): Sex reversal and comparative data undermine the W chromosome and support Z-linked DMRT1 as the regulator of gonadal sex differentiation in birds. *Endocrinology*, 158(9), 2970-2987.
- Huang, B., Luo, N., Wu, X. H., Xu, Z. X., Wang, X. X., & Pan, X. J. (2019): The modulatory role of low concentrations of bisphenol A on tamoxifen-induced proliferation and apoptosis in breast cancer cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(3), 2353-2362.
- Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., & Pickford, D. B. (2006): Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology*, 76(1), 69-92.
- Institute for Environment and Health. (2001): Testing requirements for proposals under the EC White Paper 'Strategy for a future chemicals policy'. (Vol. Web Report W6). Institute for Environment and Health Leicester.
- Intarapat, S., Sailasuta, A., & Satayalai, O. (2014): Anatomical and histological changes of reproductive organs in Japanese quail (*Coturnix japonica*) embryos after *in ovo* exposure to genistein. *International Journal of Poultry Science*, 13(1), 1-13.
- Intarapat, S., Sailasuta, A., & Satayalai, O. (2016): Immunohistochemical localization of estrogen receptor in the embryonic gonad of male quail embryo during gonadal differentiation. *International Journal of Morphology*, 34(2), 575-579.
- Intarapat, S., & Stern, C. D. (2014): Left-right asymmetry in chicken embryonic gonads. *Journal of Poultry Science*, 51(4), 352-358.
- Ioannidis, J., Taylor, G., Zhao, D. B., Liu, L., Idoko-Akoh, A., Gong, D. Q., Lovell-Badge, R., Guioli, S., McGrew, M. J., & Clinton, M. (2021): Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(10), e2020909118.
- Ishimaru, Y., Komatsu, T., Kasahara, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Toyama, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., Chandraratna, R. A. S., Morohashi, K. I., & Yoshioka, H. (2008): Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development*, 135(4), 677-685.
- Jacob, M., Bakst, M.R. (2007): Anatomy of the female reproductive tract. In: Jamieson B.G.M. (ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds*, Vol. 6a, 553-587. Science Publishers, USA.
- Jessl, L., Lenz, R., Massing, F. G., Scheider, J., & Oehlmann, J. (2018b): Effects of estrogens and antiestrogens on gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *PeerJ*, 6, e5094.
- Jessl, L., Scheider, J., & Oehlmann, J. (2018a): The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for mammalian experiments – Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals. *Chemosphere*, 196, 502-513.
- Jessl, L., Oehlmann, J. (2023): No effects of the antiandrogens CPA, flutamide and *p,p'*-DDE on early sexual differentiation but CPA-induced retardation of embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *PeerJ*, eingereicht (Manuskript-ID 86820).
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. A. (2015): Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(4), 557-568.
- Kagami, H., & Hanada, H. (1997): Current knowledge of sexual differentiation in domestic fowl. *Worlds Poultry Science Journal*, 53(2), 111-123.

- Kaku, A., Chang, C., Tamura, T., Okamoto, T., & Yoshimura, Y. (1993): Immunolocalization of androgen receptor in the cloacal gland of male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Japanese poultry science, 30(6), 413-418.
- Kamata, R., Shiraishi, F., Takahashi, S., Shimizu, A., Nakajima, D., Kageyama, S., Sasaki, T., & Temma, K. (2013): The effect of transovarian exposure to *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE on avian reproduction using Japanese quails. Journal of Toxicological Sciences, 38(6), 903-912.
- Katoh, H., Ogino, Y., & Yamada, G. (2006): Cloning and expression analysis of androgen receptor gene in chicken embryogenesis. FEBS Letters, 580(6), 1607-1615.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., & Tilson, H. A. (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environmental Health Perspectives, 104(Suppl 4), 715-740.
- Keibel, F., & Abraham, K. (1900): Normentafel zur Entwicklungsgeschichte des Huhnes, *Gallus domesticus*. Fischer, Jena.
- Kojima, H., Takeuchi, S., Itoh, T., Iida, M., Kobayashi, S., & Yoshida, T. (2013): *In vitro* endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors. Toxicology, 314(1), 76-83.
- Koo, G. C., Allen, H. L., Long, R. A., Seriodunn, R., Goggin, B., & Weppelman, R. M. (1985): Effect of tamoxifen on H-antigen expression and gonadal development in chicken embryos. Differentiation, 29(2), 140-144.
- Kozelka, A. W., & Gallagher, T. F. (1934): Effect of male hormone extracts theelin and theelol on the chick embryo. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 31(9), 1143-1144.
- Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M., & Taketani, Y. (2002): The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. Endocrine Journal, 49(4), 465-471.
- Laham, S., Long, G., & Broxup, B. (1984): Subacute oral toxicity of tri-n-butyl phosphate in the Sprague-Dawley rat. Journal of Applied Toxicology, 4(3), 150-154.
- Lambeth, L. S., Cummins, D., Doran, T. J., Sinclair, A. H., & Smith, C. A. (2013): Overexpression of aromatase alone is sufficient for ovarian development in genetically male chicken embryos. PLOS One, 8(6), 11.
- Lambeth, L. S., Raymond, C. S., Roeszler, K. N., Kuroiwa, A., Nakata, T., Zarkower, D., & Smith, C. A. (2014): Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. Developmental Biology, 389(2), 160-172.
- Lan, N. C., & Katzenellenbogen, B. S. (1976): Temporal relationships between hormone receptor-binding and biological responses in uterus - Studies with short-acting and long-acting derivatives of estriol. Endocrinology, 98(1), 220-227.
- Landauer, W., & Salam, N. (1972): Aspects of dimethyl sulfoxide as solvent for teratogens. Developmental Biology, 28(1), 35-46.
- Lange, I. G., Hartel, A., & Meyer, H. H. D. (2002): Evolution of oestrogen functions in vertebrates. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 83(1-5), 219-226.
- Lee, H. J., Seo, M., Choi, H. J., Rengaraj, D., Jung, K. M., Park, J. S., Lee, K. Y., Kim, Y. M., Park, K. J., Han, S. T., Lee, K. H., Yao, H. H. C., & Han, J. Y. (2021): DMRT1 gene disruption alone induces incomplete gonad feminization in chicken. FASEB Journal, 35(9).
- Leitman, D. C., Paruthiyil, S., Vivar, O. I., Saunier, E. F., Herber, C. B., Cohen, I., Tagliaferri, M., & Speed, T. P. (2010): Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. Current Opinion in Pharmacology, 10(6), 629-636.
- Leitner, G., Landsman, T., Blum, O., Zaltsmann, N., & Heller, E. D. (1996): Effects of gonadal steroids and their antagonists on the humoral immune response of immune-selected broiler chicks. Poultry Science, 75(11), 1373-1382.
- Liang, T., Ouyang, J., Yi, L., Chu, Y., & Liu, C. (2013): Behavioral changes of rats after short-term exposure to di-(2-ethyl hexyl) phthalate. Journal of Southern Medical University, 33(3), 401-405.
- MacGregor, J. I., & Jordan, V. C. (1998): Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. Pharmacological Reviews, 50(2), 151-196.

- MacLaughlin, D. T., Hutson, J. M., & Donahoe, P. K. (1983): Specific estradiol binding in embryonic Mullerian ducts - A potential modulator of regression in the male and female chick. *Endocrinology*, 113(1), 141-145.
- Manciocco, A., Chiarotti, F., Vitale, A., Calamandrei, G., Laviola, G., & Alleva, E. (2009): The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease: The case of Parkinson's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(1), 18-32.
- Marlatt, V. L., Bayen, S., Castaneda-Cortes, D., Delbes, G., Grigorova, P., Langlois, V. S., Martyniuk, C. J., Metcalfe, C. D., Parent, L., Rwigemera, A., Thomson, P., & Van der Kraak, G. (2022): Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife and humans. *Environmental Research*, 208, 112584.
- Matsushita, S., Yamashita, J., Iwasawa, T., Tomita, T., & Ikeda, M. (2006): Effects of *in ovo* exposure to imazalil and atrazine on sexual differentiation in chick gonads. *Poultry Science*, 85(9), 1641-1647.
- Matthiessen, P. (2013): *Endocrine Disrupters: Hazard Testing and Assessment Methods*. Wiley, Hoboken (New Jersey).
- Mattsson, A., & Brunstrom, B. (2017): Effects of selective and combined activation of estrogen receptor α and β on reproductive organ development and sexual behaviour in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *PLOS One*, 12(7), e0180548.
- Mattsson, A., Olsson, J. A., & Brunstrom, B. (2008): Selective estrogen receptor α activation disrupts sex organ differentiation and induces expression of vitellogenin II and very low-density apolipoprotein II in Japanese quail embryos. *Reproduction*, 136(2), 175-186.
- Mattsson, A., Olsson, J. A., & Brunstrom, B. (2011): Activation of estrogen receptor α disrupts differentiation of the reproductive organs in chicken embryos. *General and Comparative Endocrinology*, 172(2), 251-259.
- McGary, S., Henry, P. F. P., & Ottinger, M. A. (2001): Impact of vinclozolin on reproductive behavior and endocrinology in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2487-2493.
- Mentor, A., Bornehag, C.-G., Jönsson, M., & Mattsson, A. (2020a): A suggested bisphenol A metabolite (MBP) interfered with reproductive organ development in the chicken embryo while a human-relevant mixture of phthalate monoesters had no such effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 83(2), 66-81.
- Mentor, A., Wänn, M., Brunström, B., Jönsson, M., & Mattsson, A. (2020b): Bisphenol AF and bisphenol F induce similar feminizing effects in chicken embryo testis as bisphenol A. *Toxicological Sciences*, 178(2), 239-250.
- Morán, M. G. (2005): Immunohistochemical detection of estrogen receptor α in the growing and regressing ovaries of newly hatched chicks. *Journal of Molecular Histology*, 36(1-2), 147-155.
- Morgan, W. (1974): Toxic effect of a radioprotectant (DMSO) on young chicken embryos. *Poultry Science*, 53(5), 1958-1958.
- Morris, K. R., Hirst, C. E., Major, A. T., Ezaz, T., Ford, M., Bibby, S., Doran, T. J., & Smith, C. A. (2018): Gonadal and endocrine analysis of a gynandromorphic chicken. *Endocrinology*, 159(10), 3492-3502.
- Müller, W., Groothuis, T. G. G., Eising, C. M., & Dijkstra, C. (2005): An experimental study on the causes of sex-biased mortality in the black-headed gull – The possible role of testosterone. *Journal of Animal Ecology*, 74(4), 735-741.
- Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T., & Mizuno, S. (1998): Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *Journal of Molecular Endocrinology*, 20(2), 193-202.
- Nakamura, Y., Kagami, H., & Tagami, T. (2013): Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Development Growth & Differentiation*, 55(1), 20-40.
- Neumann, F. (1982): Pharmacology and clinical use of antiandrogens - A short review. *Irish Journal of Medical Science*, 151(3), 61-70.
- Neumann, F., & Topert, M. (1986): Pharmacology of antiandrogens. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 25(5B), 885-895.

- Niemann, L., Haider, W., Grote, K., & Chahoud, I. (2010): Histopathology of the testis as a sensitive tool to detect potentially adverse effects of environmental chemicals on male fertility in Japanese quail. *Avian Biology Research*, 3(1), 35-38.
- Nishikimi, H., Kansaku, N., Saito, N., Usami, M., Ohno, Y., & Shimada, K. (2000): Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Molecular Reproduction and Development*, 55(1), 20-30.
- OECD. (1984): OECD guideline for the testing of chemicals No. 206. Avian reproduction test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2001): OECD guideline for the testing of chemicals No. 416. Two-generation reproduction toxicity. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2007a): Detailed review paper for avian two-generation toxicity test (Vol. ENV/JM/MONO(2007)21). Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2007b): OECD guideline for the testing of chemicals No. 440. Uterotrophic bioassay in rodents. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2009): OECD guideline for the testing of chemicals No. 441. Hershberger bioassay in rats. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2011): OECD guideline for the testing of chemicals No. 456. H295R steroidogenesis assay. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2012a): Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption (Vol. 150). Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2012b): OECD guideline for the testing of chemicals No. 457. BG1Luc estrogen receptor transactivation test method for identifying estrogen receptor agonists and antagonists. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2015a): OECD guideline for the testing of chemicals No. 422. Combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2015b): OECD guideline for the testing of chemicals No. 493. Performance-based test guideline for human recombinant estrogen receptor (hrER) *in vitro* assays to detect chemicals with ER binding affinity. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2016): OECD guideline for the testing of chemicals No. 421. Reproduction/developmental toxicity screening test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2018a): OECD guideline for the testing of chemicals No. 414. Prenatal developmental toxicity study. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2018b): OECD guideline for the testing of chemicals No. 443. Extended one-generation reproductive toxicity study. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2018c): Revised guidance document 150 on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. (2023a): Avian toxicity testing. Abgerufen von: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/avian-toxicity-testing.htm>. Abrufdatum: 08.06.2023.
- OECD. (2023b): OECD Test Guidelines Programme. Abgerufen von: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecd-guidelines-testing-chemicals-related-documents.htm>. Abrufdatum: 08.06.2023.
- Osborne, C. K., Coronadoheinsohn, E. B., Hilsenbeck, S. G., McCue, B. L., Wakeling, A. E., McClelland, R. A., Manning, D. L., & Nicholson, R. I. (1995): Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast-cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(10), 746-750.
- Ottinger, M. A., & Abdelnabi, M. A. (1997): Neuroendocrine systems and avian sexual differentiation. *American Zoologist*, 37(6), 514-523.
- Ottinger, M. A., Pitts, S., & Abdelnabi, M. A. (2001): Steroid hormones during embryonic development in Japanese quail: Plasma, gonadal, and adrenal levels. *Poultry Science*, 80(6), 795-799.

- Panzica, G., Mura, E., Pessatti, M., & Viglietti-Panzica, C. (2005): Early embryonic administration of xenoestrogens alters vasotocin system and male sexual behavior of the Japanese quail. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 436-445.
- Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J. A., Tyler, C. R., & Braunbeck, T. (2004a): Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*, 68(3), 277-291.
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C. R., & Braunbeck, T. (2004b): Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(3), 330-345.
- Peakall, D. B., & Lincer, J. L. (1996): Do PCBs cause eggshell thinning? *Environmental Pollution*, 91(1), 127-129.
- Perrin, F. M., Stacey, S., Burgess, A. M., & Mittwoch, U. (1995): A quantitative investigation of gonadal feminization by diethylstilboestrol of genetically male embryos of the quail *Coturnix coturnix japonica*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103(2), 223-226.
- PPDB. (2023): Terbutryn (Ref: GS 14260). Abgerufen von: sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/624.htm. Abrufdatum: 08.06.2023.
- Quinn, J. M. J., & Ottinger, M. A. (2006): Embryonic effects of androgen active endocrine disrupting chemicals on avian immune and reproductive systems. *The Journal of Poultry Science*, 43(1), 1-11.
- Quinn, M. J., Lavoie, E. T., & Ottinger, M. A. (2007a): Reproductive toxicity of trenbolone acetate in embryonically exposed Japanese quail. *Chemosphere*, 66(7), 1191-1196.
- Quinn, M. J., Summitt, C. L., & Ottinger, M. A. (2008): Consequences of *in ovo* exposure to *p,p'*-DDE on reproductive development and function in Japanese quail. *Hormones and Behavior*, 53(1), 249-253.
- Ratcliffe, D. A. (1970): Changes attributable to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some british birds. *Journal of Applied Ecology*, 7(1), 67-115.
- Ritchie, M., & Pilny, A. A. (2008): The anatomy and physiology of the avian endocrine system. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(1), 1-14.
- Robinzon, B., Rozenboim, I., Arnon, E., & Snapir, N. (1990): The effect of tamoxifen on semen fertilization capacity in White Leghorn male chicks. *Poultry Science*, 69(7), 1220-1222.
- Romanoff, A. L. (1960): *The avian embryo: Structural and functional development*. Macmillan, New York.
- Romanoff, A. L., & Romanoff, A. J. (1972): *Pathogenesis of the avian embryo - An analysis of causes of malformations and prenatal death*. Wiley, New York.
- Rozenboim, I., Dgany, O., Robinzon, B., Arnon, E., & Snapir, N. (1989): The effects of tamoxifen on the reproductive traits in White Leghorn cockerels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 32(2), 377-381.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959): *The principles of humane experimental technique*. Reprinted (1992): UFAW, Wheathampstead.
- Sakimura, M., Tsukada, A., Usami, M., Hanzawa, S., Saito, N., Ohno, Y., & Shimada, K. (2002): Effect of estradiol and nonylphenol on mRNA expression of estrogen receptors α and β , and cytochrome P450 aromatase in the gonad of chicken embryos. *The Journal of Poultry Science*, 39(4), 302-309.
- Salzgeber, B., Reysbrion, M., & Baulieu, E. E. (1981): Modification of the female gonads in the chick-embryo induced by tamoxifen. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie III - Life Sciences*. 293, 133-138.
- Samsel, J., Zeis, A., & Weniger, J. P. (1982): Feminization in the chick-embryo testis by diethylstilbestrol and antagonizing action of tamoxifen. *Biochimie*, 64(5), 369-376.
- Scanes, C. G., & McNabb, F. M. A. (2003): Avian models for research in toxicology and endocrine disruption. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 14(1), 21-52.
- Scheib, D. (1983): Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation*, 23, 87-92.

- Scheib, D., Guichard, A., Mignot, T. M., & Cedard, L. (1981): Steroidogenesis by gonads of normal and of diethylstilbestrol-treated quail embryos - Radioimmunoassays on organ-cultures. *General and Comparative Endocrinology*, 43(4), 519-526.
- Scheib, D., Guichard, A., Mignot, T. M., & Reyssbrion, M. (1985): Early sex-differences in hormonal potentialities of gonads from quail embryos with a sex-linked pigmentation marker - An *in vitro* radioimmunoassay study. *General and Comparative Endocrinology*, 60(2), 266-272.
- Scheib, D., & Reyssbrion, M. (1979): Feminization of the quail by early diethylstilbestrol treatment - Histoenzymological investigations on steroid dehydrogenases in the gonads. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, 68(2), 85-98.
- Scheider, J. (2019): Entwicklung einer Tierversuchersatzmethode für endokrine Disruptoren - Grundlagenuntersuchungen am Hühnerembryo. Dissertationsschrift. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main.
- Scheider, J., Afonso-Grunz, F., Hoffmeier, K., Horres, R., Groher, F., Rycak, L., Oehlmann, J., & Winter, P. (2014): Gene expression of chicken gonads is sex- and side-specific. *Sexual Development*, 8(4), 178-191.
- Scheider, J., Afonso-Grunz, F., Jessl, L., Hoffmeier, K., Winter, P., & Oehlmann, J. (2018): Morphological and transcriptomic effects of endocrine modulators on the gonadal differentiation of chicken embryos: The case of tributyltin (TBT). *Toxicology Letters*, 284, 143-151.
- Schenck, B., & Neumann, F. (1973): Influence of sexual hormones on bone maturation and bone growth of female rats. *Arzneimittel-Forschung*, 23(7), 887-907.
- Schumacher, M., Sulon, J., & Balthazart, J. (1988): Changes in serum concentrations of steroids during embryonic and post-hatching development of male and female Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Endocrinology*, 118(1), 127-134.
- Selzsam, B., Grote, K., Gericke, C., Niemann, L., Wittfoht, W., & Chahoud, I. (2005): Effects of methyltestosterone on reproduction in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Environmental Research*, 99(3), 327-334.
- She, Z.-Y., & Yang, W.-X. (2017): Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development?. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 63, 13-22.
- Shibuya, K., Mizutani, M., Sato, K., Itabashi, M., & Nunoya, T. (2005): Comparative evaluation of sex reversal effects of natural and synthetic estrogens in sex reversal test using F1 (AWE×WE) Japanese quail embryos. *Journal of Poultry Science*, 42, 119-129.
- Shibuya, K., Mizutani, M., Wada, M., Sato, K., & Nunoya, T. (2004): A new screening model using F1 (AWE×WE) Japanese quail embryo for evaluating sex reversal effects. *Journal of Toxicologic Pathology*, 17(4), 245-252.
- Shimada, K. (1998): Gene expression of steroidogenic enzymes chicken embryonic gonads. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 450-456.
- Shimada, K. (2002): Sex determination and sex differentiation. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 13(1), 1-14.
- Shou, J., Massarweh, S., Osborne, C. K., Wakeling, A. E., Ali, S., Weiss, H., & Schiff, R. (2004): Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(12), 926-935.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R., & Goodfellow, P. N. (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240-244.
- Smeds, L., Warmuth, V., Bolivar, P., Uebbing, S., Burri, R., Suh, A., Nater, A., Bures, S., Garamszegi, L. Z., Hogner, S., Moreno, J., Qvarnstrom, A., Ruzic, M., Saether, S. A., Saetre, G. P., Torok, J., & Ellegren, H. (2015): Evolutionary analysis of the female-specific avian W chromosome. *Nature Communications*, 6, 7330.
- Smith, C. A. (2010): Sex determination in birds: A review. *Emu - Austral Ornithology*, 110(4), 364-377.
- Smith, C. A., Andrews, J. E., & Sinclair, A. H. (1997): Gonadal sex differentiation in chicken embryos: Expression of estrogen receptor and aromatase genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 62(4), 361-361.

- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Bowles, J., Koopman, P., & Sinclair, A. H. (2008): Onset of meiosis in the chicken embryo; Evidence of a role for retinoic acid. *BMC Developmental Biology*, 8, 85.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J., & Sinclair, A. H. (2009): The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261), 267-271.
- Smith, C. A., & Sinclair, A. H. (2004): Sex determination: Insights from the chicken. *Bioessays*, 26(2), 120-132.
- Solecki, R., Kortenkamp, A., Bergman, Å., Chahoud, I., Degen, G. H., Dietrich, D., Greim, H., Håkansson, H., Hass, U., Husoy, T., Jacobs, M., Jobling, S., Mantovani, A., Marx-Stoelting, P., Piersma, A., Ritz, V., Slama, R., Stahlmann, R., van den Berg, M., Zoeller, R. T., & Boobis, A. R. (2017): Scientific principles for the identification of endocrine-disrupting chemicals: A consensus statement. *Archives of Toxicology*, 91(2), 1001-1006.
- Sotonyi, P. T., & Csaba, G. (1986): Effect of prenatal and or neonatal diethylstilbestrol (DES) or allylestrenol (AE) treatment on the postnatal-development of the chicken ovary. *Acta Biologica Hungarica*, 37(3-4), 189-196.
- Starck, M., & Ricklefs, R. (1997): Avian growth and development: Evolution within the altricial-precocial spectrum (Vol. 1). Oxford University Press, Oxford.
- Stevens, A.-S., Pirotte, N., Plusquin, M., Willems, M., Neyens, T., Artois, T., & Smeets, K. (2015): Toxicity profiles and solvent-toxicant interference in the planarian *Schmidtea mediterranea* after dimethylsulfoxide (DMSO) exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 35(3), 319-326.
- Stevens, L. (1997): Sex chromosomes and sex determining mechanisms in birds. *Science Progress*, 80 (Pt 3), 197-216.
- Swan, S. H., Elkin, E. P., & Fenster, L. (2000): The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environmental Health Perspectives*, 108(10), 961-966.
- Tanabe, Y., Nakamura, T., Fujioka, K., & Doi, O. (1979): Production and secretion of sex steroid-hormones by the testes, the ovary, and the adrenal-glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 39(1), 26-33.
- Tanabe, Y., Yano, T., & Nakamura, T. (1983): Steroid-hormone synthesis and secretion by testes, ovary, and adrenals of embryonic and post-embryonic ducks. *General and Comparative Endocrinology*, 49(1), 144-153.
- Tanaka, R., Izumi, H., & Kuroiwa, A. (2017): Androgens and androgen receptor signaling contribute to ovarian development in the chicken embryo. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 443, 114-120.
- Taylor, K. (2018): Ten years of REACH - An animal protection perspective. *Alternatives to Laboratory Animals*, 46(6), 347-373.
- TEDX. (2018): List of potential endocrine disruptors. Abgerufen von: <http://endocrinedisruption.org/interactive-tools/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/search-the-tedx-list>. Abrufdatum: 08.06.2023.
- Temple, D., Springer, T., Gallagher, S., du Hoffmann, G., & Wheeler, J. R. (2020): The value of avian gross pathology in identifying endocrine disrupting properties. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 112, 104577.
- Ukeshima, A. (1994): Abandonment of germ-cells in the embryonic chick ovary: TEM and SEM studies. *Anatomical Record*, 240(2), 261-266.
- USEPA. (2009): Endocrine disruptor screening program test guidelines No. 890.1150. Androgen receptor binding (rat prostate cytosol). United States Environmental Protection Agency.
- USEPA. (2012a): Ecological effects test guidelines No. 850.2300. Avian reproduction test. United States Environmental Protection Agency.
- USEPA. (2012b): Endocrine disruptor screening program, universe of chemicals. Abgerufen von: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-07/documents/edsp_chemical_universe_list_11_12.pdf. Abrufdatum: 08.06.2023.
- USEPA. (2015): Endocrine disruptor screening program test guidelines No. 890.2100. Avian two-generation toxicity test in the Japanese quail. United States Environmental Protection Agency.

- Utsumi, T., & Yoshimura, Y. (2009): Sensitive embryonic endpoints with *in ovo* treatment for detecting androgenic and anti-androgenic effects of chemicals in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Poultry Science, 88(5), 1052-1059.
- Utsumi, T., & Yoshimura, Y. (2011): Applicability of lectin histochemistry in a test system with *in ovo* treatment for detecting androgenic and antiandrogenic effects of chemicals in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Poultry Science, 90(1), 168-174.
- Vaillant, S., Dorizzi, M., Pieau, C., & Richard-Mercier, N. (2001b): Sex reversal and aromatase in chicken. Journal of Experimental Zoology, 290(7), 727-740.
- Vaillant, S., Magre, S., Dorizzi, M., Pieau, C., & Richard-Mercier, N. (2001a): Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. Developmental Dynamics, 222(2), 228-237.
- Valizadeh, E., & Seratinouri, H. (2013): Effects of garlic extract, anti-estrogens, and aromatase inhibitor on sex differentiation in embryo. International Journal of Womens Health and Reproduction Sciences, 1(2), 51-55.
- Van der Jagt, K., Munn, S., Tørsløv, J., & de Bruijn, J. (2004): Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. Ispra, Italy: Institute for Health and Consumer Protection.
- Velisek, J., Stara, A., Kolarova, J., & Svobodova, Z. (2011): Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (*Cyprinus carpio L.*) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. Pesticide Biochemistry and Physiology, 100(3), 305-313.
- Villalpando, I., Sanchez-Bringas, G., Sanchez-Vargas, I., Pedernera, E., & Villafan-Monroy, H. (2000): The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. General and Comparative Endocrinology, 117(3), 325-334.
- Vitale, A., Manciocco, A., & Alleva, E. (2009): The 3R principle and the use of non-human primates in the study of neurodegenerative diseases: The case of Parkinson's disease. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 33(1), 33-47.
- Wakeling, A. E. (1995): Use of pure antiestrogens to elucidate the mode of action of estrogens. Biochemical Pharmacology, 49(11), 1545-1549.
- Wakeling, A. E., & Bowler, J. (1987): Steroidal pure antiestrogens. Journal of Endocrinology, 112(3), R7-R10.
- Wakeling, A. E., Dukes, M., & Bowler, J. (1991): A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. Cancer Research, 51(15), 3867-3873.
- Wang, Y., Jin, G., Ma, M., & Xiang, X. (2019): Sex differences in serum steroid hormone levels during embryonic development in hen eggs. Poultry Science, 98(11), 6053-6062.
- Wang, Z., Liu, H. Y., & Liu, S. J. (2017): Low-dose bisphenol A exposure: A seemingly instigating carcinogenic effect on breast cancer. Advanced Science, 4(2), 1600248.
- Wardley, A. M. (2002): Fulvestrant: A review of its development, pre-clinical and clinical data. International Journal of Clinical Practice, 56(4), 305-309.
- Webb, P., Lopez, G. N., Uht, R. M., & Kushner, P. J. (1995): Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway - Potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. Molecular Endocrinology, 9(4), 443-456.
- Weniger, J. P., Samsel, J., & Zeis, A. (1981): Tamoxifen antagonizes the feminizing effect of androgens on the chick-embryo. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie III - Life Sciences. 293, 451-452.
- Weybridge Conference. (1996): European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Report of proceedings, EUR 17549, DGXII of the European Commission. Weybridge Conference.
- WHO/IPCS. (1991). Tri-*n*-butyl phosphate. Geneva: World Health Organisation.
- WHO/IPCS. (2002). Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors. Geneva: World Health Organization.
- Willier, B. H. (1952): Development of sex-hormone activity of the avian gonad. Annals of the New York Academy of Sciences, 55(2), 159-171.

- Willier, B. H., Gallagher, T. F., & Koch, F. C. (1935): Sex-modification in the chick embryo resulting from injections of male and female hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 21, 625-631.
- Wolff, E. (1979): Old experiments and new trends in avian sex differentiation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association*, 15(1), 6-10.
- Woods, J. E., & Brazzill, D. M. (1981): Plasma 17 β -estradiol levels in the chick-embryo. *General and Comparative Endocrinology*, 44(1), 37-43.
- Woods, J. E., & Erton, L. H. (1978): Synthesis of estrogens in the gonads of the chick-embryo. *General and Comparative Endocrinology*, 36(3), 360-370.
- Woods, J. E., & Podczaski, E. S. (1974): Androgen synthesis in gonads of chick-embryo. *General and Comparative Endocrinology*, 24(4), 413-423.
- Woods, J. E., Simpson, R. M., & Moore, P. L. (1975): Plasma testosterone levels in chick-embryo. *General and Comparative Endocrinology*, 27(4), 543-547.
- Wyatt, R. D., & Howarth, B. (1976): Effect of dimethyl-sulfoxide on embryonic survival and subsequent chick performance. *Poultry Science*, 55(2), 579-582.
- Xu, L. H., & Zhou, Q. (2020): The female-specific W chromosomes of birds have conserved gene contents but are not feminized. *Genes*, 11(10), 1126.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., & Takatuki, M. (2001): Effects of olive, corn, sesame or peanut oil on the body weights and reproductive organ weights of immature male and female rats. *Experimental Animals*, 50(2), 173-177.
- Yoshida, K., Shimada, K., & Saito, N. (1996): Expression of P450_{17 α} hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 102(2), 233-240.
- Yoshimura, Y., & Kawai, H. (2002): Structures and androgen receptor localization in the testes and epididymis of Japanese quail hatched from the eggs exposed to diethylstilbestrol. *Journal of Reproduction and Development*, 48(1), 79-85.
- Yoshino, T., & Saito, D. (2019): Epithelial-to-mesenchymal transition-based morphogenesis of dorsal mesentery and gonad. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 92, 105-112.

ANHANG

A.1 The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for mammalian experiments – Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals

Luzie Jessl, Jessica Scheider, Jörg Oehlmann

Erschienen in:

Chemosphere

Volume: 196 (2018)

Seiten: 502-513

Erklärung zu den Autorenteilen an der Publikation: The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for mammalian experiments – Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals

Status: publiziert

Name der Zeitschrift: Chemosphere (Volume 196 (2018), Seiten 502-513)

Beteiligte Autoren: Luzie Jessl (LJ), Jessica Scheider (JS), Jörg Oehlmann (JO)

Was hat die Promovierende bzw. was haben die Co-Autoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierende LJ:	50%
Co-Autor JS:	40%
Co-Autor JO:	10%

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierende LJ:	70% (Injektion, Bebrütung, Gonadenisolation, Histologie)
Co-Autor JS:	30% (Injektion, Bebrütung, Gonadenisolation, Histologie)

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierende LJ:	70% (Aufarbeitung aller Rohdaten, Erstellung von Abbildungen)
Co-Autor JS:	30% (Aufarbeitung aller Rohdaten, Erstellung von Abbildungen)

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierende LJ:	80% (Interpretation und Analyse, Publikationsrecherche)
Co-Autor JS:	20% (Interpretation und Analyse, Publikationsrecherche)

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierende LJ:	70%
Co-Autor JS:	20%
Co-Autor JO:	10%



The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for mammalian experiments – Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals

Luzie Jessl^{*}, Jessica Scheider, Jörg Oehlmann

Goethe University Frankfurt am Main, Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Department Aquatic Ecotoxicology, Max-von-Laue-Str. 13, 60438 Frankfurt am Main, Germany



HIGHLIGHTS

- The first study to systematically examine the variability of individual parameters in control groups of chicken embryos.
- The low natural variability of the test system results in a good reproducibility in control and substance-treated groups.
- Reference values for developmental and gonadal endpoints, suggested as validity criteria, are provided.
- The chicken embryo is a suitable system for the detection of EDCs and a promising alternative to mammalian experiments.

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 28 December 2017

Handling Editor: David Volz

Keywords:

Chicken embryo
Gonad
Sex differentiation
Animal replacement
Bisphenol A
17 α -ethinylestradiol

ABSTRACT

In recent decades the embryo of *Gallus g. domesticus* has been widely used as a model for the study of early sexual development and the potential impact of substances affecting development, including endocrine disrupting chemicals (EDCs). Since there is no standardized procedure available for experiments with the chicken embryo, the objective of our project is to expedite the protocol to assess the potential effects of EDCs on early sexual differentiation. The main aim of the present study was to systematically investigate the natural variability of individual developmental and histological key parameters in untreated and solvent-treated control groups, since this has been insufficiently addressed so far. A further aim was to provide robust values for all parameters investigated in control and substance experiments, using two known estrogenic compounds, bisphenol A (75/150/300 μ g/g egg) and 17 α -ethinylestradiol (20 ng/g egg). On embryonic day 1 eggs were injected with the estrogenic compounds. On embryonic day 19 histological gonadal data as well as morphological parameters were noted. In baseline experiments with control groups the selected endpoints showed reproducible results with low variabilities. Furthermore, gonadal endpoints responded sensitively to the treatment with the two model EDCs. Thus, these endpoints are recommended for the assessment of suspected EDCs in which the values provided for all parameters can serve as validity criteria in future experiments. The embryo of *G. domesticus* has shown to be a suitable alternative to currently accepted mammalian bioassays for the impact assessment of EDCs on reproductive tissues.

© 2017 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Reproductive disorders in animals and humans caused by chemical substances that are suspected as endocrine disrupters have gained major interest for science and society. Especially the

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: jessl@bio.uni-frankfurt.de (L. Jessl), j.scheider@bio.uni-frankfurt.de (J. Scheider), oehlmann@bio.uni-frankfurt.de (J. Oehlmann).

interference of these chemicals with sexual development and reproduction plays a major role. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are naturally or synthetically occurring compounds and may affect the natural balance of hormones or alter the endocrine control in animals. Various studies confirm the suspicion that EDCs may adversely affect wildlife and human health (Colborn et al., 1993; Giesy et al., 2003; Vandenberg et al., 2012; Mallozzi et al., 2016). In view of the large number of constantly used chemicals, e.g. in agriculture, industry or medicine, it is expected that EDCs

end up in the environment and may be incorporated by animals and humans and, thus, may impact their hormonal systems. Only a small proportion of these substances has been tested for potential effects on the hormonal system. The pending investigation of further substances will therefore produce a high demand for animal experiments in the coming years, since most of these substances have to be tested *in vivo*.

The Hershberger assay and uterotrophic assay are two internationally standardized tests for EDCs with androgenic or estrogenic activity, which are based on rodents (OECD, 2007, 2009). These tests use juvenile or adult rats or mice and, thus, not the most sensitive life stage for EDCs, the developing embryo (Lan and Katzenellenbogen, 1976; Cook et al., 1997; Grote et al., 2004). Moreover, the critical effect on sexual differentiation in higher vertebrates is currently studied by a standardized multi-generational test, using quail and other avian species (OECD, 1984). However, this test is time intensive and costly and a very high number of individuals is needed. As a result, nearly 2.7 million vertebrates are annually consumed for animal testing throughout Germany, almost 256,600 of them for toxicological studies (BMELV, 2015). This high number is hardly acceptable for animal welfare reasons, and this is why the search for a suitable animal replacement system is of great importance.

As early as 1959, Russel and Burch dealt with the subject of treating experimental animals in a more human way (Russel and Burch, 1959, reprinted 1992). Their principle of the 3Rs represents the widely accepted ethical standard for the use of animal experiments, which is already being implemented and applied in many laws and technical guidelines. The 3Rs stand for Replacement, Reduction and Refinement.

An interesting and promising approach to avoid animal testing is the development of a standardized procedure for the testing of potential EDCs in avian embryos. In recent years, the avian embryo has emerged as a model for the study of environmental pollutants, including EDCs (Fry and Toone, 1981; Fry, 1995; Berg et al., 1998, 1999, 2001a, 2001b, 2004; Berge et al., 2004; Biau et al., 2007; Brunstrom and Halldin, 2000). The present study is part of a project aiming to advance a replacement method for testing hormonally active compounds in birds, where fertilized eggs of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) are used (Berg et al., 1998, 1999). Chicken eggs provide significant advantages in the testing of chemicals, as they are available throughout the year and the injection of substances directly into the yolk allows specific and standardized dosages (Berg et al., 1999). As the hen affects the development of its offspring by transferred genetic materials as well as hormones (Carere and Balthazart, 2007), substances incorporated by the mother may consequently also influence the development of the offspring even originally or as metabolites in the allantoic fluid (Kamata et al., 2006). However, in contrast to developing mammals or aquatic species, the chicken egg is a closed system lacking any exchange with its environment except for the interchange of gases. Thus, one injection of a test compound results in chronic chemical exposure, because no exchange or loss of the substance is possible. A single injection may therefore be sufficient to influence the developing embryo (Davies et al., 1997; Gooding et al., 2003; McAllister and Kime, 2003; Zhang et al., 2007). The embryonic development is fully described (Keibel and Abraham, 1900; Hamburger and Hamilton, 1992; Starck and Ricklefs, 1997) and the individual developmental stages are clearly visible and easily accessible. Also the endocrine system of adult birds is largely similar to that of mammals (Lange et al., 2002) which allows a limited transfer of the resulting data to humans, as little differences still exist, e.g. the genetic and endocrine control of gonadal development is not identical to humans. It is known that the influence of xenohormones in birds during embryonic development can lead to

irreversible malformations of the gonads or later to a disturbed gender-related behavior, whereas EDCs may exert less severe and often reversible effects in the less sensitive adult stage (Adkins-Regan, 1990; Ottinger and Abdelnabi, 1997). Therefore, the chicken embryo is a suitable model for the study of early sexual development and the potential impact of EDCs regarding the replacement for other vertebrate or even mammalian models.

However, the characterization of the normal development of the test organism without exposure to EDCs should be a first and fundamental step for the successful development of a test design based on chicken embryos. Based on previously published studies we decided for different common and gonad-based endpoints which have already been shown to be affected by EDCs (Scheib and Reysbrion, 1979; Scheib and Baulieu, 1981; Scheib, 1983; Berg et al., 1998, 1999; Halldin et al., 2003). These endpoints are the surface area of left and right ovary or testis, the cortex thickness of left ovary or testis and the percentage of seminiferous tubules of left testis. In an extensive series of experiments, we investigated these endpoints and worked out a detailed morphological and histological description of embryonic gonads. Special focus was on the systematic examination of the variability of individual parameters in untreated and solvent-treated control to demonstrate the natural variability of the test system. Furthermore, this may allow the determination of reliable reference values for each endpoint which may serve as validity criteria in future experiments. Also, these values could be used for the comparison between controls and substance-treated groups. Moreover, the present study draws a comparison between untreated controls and solvent controls, which received dimethyl sulfoxide (DMSO) as a solvent. At last this should allow a statement about the conformity and validity of the data of both test groups and whether DMSO is a suitable solvent for the chicken egg test. With the knowledge about the normal development of the chicken embryos it will be possible to obtain a reliable comparison between control groups and test groups treated with different EDCs.

The second step in our investigations was to evaluate the effects of the chosen EDCs on gonadal differentiation as assessed by the previously chosen endpoints. After profound analysis of existing literature we determined two promising compounds and analyzed their effects on embryonic development with special focus on potential gross morphological and histological changes of the gonads. The selected estrogenic substances 17 α -ethinylestradiol (EE₂), a synthetic hormone primarily used for contraception, and bisphenol A (BPA), a monomer used as basic material for polycarbonate plastics, have already been widely used in the study of EDC-related effects on different groups of organisms (Watts et al., 2001; Oehlmann et al., 2006; Pettersson et al., 2006; Birceanu et al., 2015) including the bird embryo (Berg et al., 1998, 1999, 2001a, 2001b, 2004; Biau et al., 2007; Oshima et al., 2012).

In the end we want to demonstrate that the test method based on chicken embryos is a suitable system for the detection of EDCs. If the chicken embryo proves to be similarly sensitive or even more sensitive to EDCs than already established tests, the successful development of a standardized test system based on chicken embryos is very promising. As an alternative to current assays, this test system could then contribute to a reduction in the number of consumed experimental animals.

2. Materials and methods

2.1. Dosing

All experiments were carried out with respect for the principles of laboratory animal care, in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and

the German Animal Welfare Act. Fertilized eggs of white Leghorn chicken (*Gallus gallus domesticus*) were obtained from a local breeder (LSL Rhein-Main, Dieburg, Germany). The eggs were incubated at $37.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $60\% \pm 10\%$ relative humidity and turned over eight times a day in a fully automated incubator (J. Hemel Brutgeräte, Verl, Germany). For the baseline experiments all trials involve the formation of two control groups, the negative control (NC), which includes unmanipulated eggs and the solvent control (SC) which received DMSO (CAS: 67-68-5; purity = 99.5%; Applichem, Darmstadt, Germany) as a carrier. In these experiments, either 15 μL or 60 μL of the solvent were used. In ovo-exposure experiments investigating the effects of EDCs additionally include an EE₂-treated group (20 ng/g egg weight; CAS: 57-63-6; purity: $\geq 98\%$; Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Germany) and three BPA-treated groups (75, 150, 300 $\mu\text{g/g}$ egg weight; CAS: 80-05-7; purity: $\geq 99\%$; Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Germany). In previous studies, these substance concentrations have proven to strongly affect the reproductive organs of chicken embryos (Berg et al., 2001b, 2004). The corresponding doses were administered to the eggs dissolved in 15 μL of the solvent.

Solvent and substances were injected into the yolk via a small hole on the circle of the widest diameter of the egg using Hamilton microliter syringes and needles (ga22s/51mm/pst2). The injection was performed on day one of incubation. After injection the hole in the shell was sealed with agarose gel (3%, in phosphate buffered saline). During incubation, eggs were periodically checked by candling to identify and discard dead embryos or unfertilized eggs.

2.2. Dissection, tissue preparation and evaluation

The embryos were dissected on day 19 of incubation, two days before anticipated hatching. Unfertilized eggs were excluded from statistics. All embryos were examined for deformations of body or inner organs. Ovaries and testes were examined for deformations under a stereo microscope. Photos of all gonads (Diskus, Carl H. Hilgers, Königswinter, Germany) were taken for further analyses of the gonad surface area, in which the entire visible surface of each single gonad was determined with an image editing program (Fiji is just ImageJ, Open Source). Gonads were dissected and fixed in Bouin's solution for 24 h. The fixative was rinsed repeatedly with 80% ethanol. Ethanol was removed by saccharose solution (10, 20 and 30% in phosphate buffered saline) before gonads were embedded in Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Netherlands). Gonads were sectioned (6 μm) by a freeze microtome (Microm HM 500 O, Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn, Germany) at $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Histological examination was performed using a light microscope (Olympus BX50, Olympus, Tokyo, Japan) and a camera (JVC Digital Camera, KY-F75U, Yokohama, Japan). In both sexes the thickness of the cortex and in male embryos additionally the percentage of the area of seminiferous tubules were measured with an image analysis system (Diskus, Carl H. Hilgers, Königswinter, Germany).

2.3. Determination of sexual genotype

DNA isolation for each individual was carried out with a tissue sample from the heart taken during dissection. Dead embryos, identified and removed before dissection, were also sampled. All embryos were typed for their sexual ZZ or ZW genotype according to Fridolfsson and Ellegren (1999), based on PCR with a single set of primers. Amplification was performed using qPCR and the primers 2550F "5'-GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA-3'" and 2718R "5'-ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG-3'". Following amplification, all qPCR

products underwent a melting curve, which resulted in characteristic bands for each sex. Male embryos had a single 600-bp CHD1-Z specific fragment with a melting temperature of nearly $84\text{ }^{\circ}\text{C}$, while females had a 600bp-CHD1-Z specific fragment and an additional 450-bp CHD1-W female-specific fragment, with a melting temperature of nearly $82\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Measurements and statistics

For the examination of the surface area of left and right gonads the data from 15 (baseline experiments with controls) or 4 (experiments with BPA and EE₂) individual experiments were analyzed. For the histological endpoints cortex thickness of left gonads as well as the percentage of seminiferous tubules in left testis, the data from 11 (baseline experiments) or 4 (experiments with BPA and EE₂) experiments were analyzed. For the baseline experiments in particular, the range of variation within the control groups, as well as any deviations among the control groups was in the focus of investigation. For experiments with BPA and EE₂ it was examined whether and how the endpoints specified in the baseline experiments respond to the treatment with EDCs.

The cortex thicknesses of male and female left gonads as well as the percentage of the area of seminiferous tubules in male left testes were measured. 10 (baseline experiments) or 5 (experiments with BPA and EE₂) sections for each embryo and endpoint were evaluated. The selected sections were exclusively taken from the gonads middle sectional plane. To determine the cortex thickness different representative areas around the gonad were chosen. From each section five measurements were performed to determine the cortex thickness. For males the area of all seminiferous tubules in a defined image section were measured to determine a representative percentage in the male left testis. Therefore random representative image sections were selected which showed only the medullary tissue but not the cortex region.

For each endpoint of the baseline experiments the mean value of each of the 11 (cortex thickness and seminiferous tubules) or 15 (gonad surface areas) individual experiments was calculated. From the mean values of the individual experiments, the arithmetic means of NC and SC were calculated. Statistical evaluation was carried out with GraphPadPrism® (version 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data of all endpoints following normal distribution were verified by *t*-test. If data did not follow normal distribution, Man-Whitney-U-test was used for analysis. Quantal data were evaluated using Fisher's exact test. In the baseline experiments we first determined within the respective control groups whether the 11 (cortex thickness and seminiferous tubules) or 15 (gonad surface areas) individual experiments statistically differ from each other (one-way ANOVA with Newman-Keuls post test). It was also determined within the respective control groups whether the individual experiments statistically differ from their arithmetic mean (one-way ANOVA with Dunnett's post test). Finally, a direct comparison of the individual experiments of NC and SC was made to analyze whether they differ from each other statistically (one-way ANOVA with Newman-Keuls post test).

For the test series with BPA and EE₂, the results of 4 test runs were merged and analyzed. Statistical evaluation was carried out according to Green and Wheeler (2013). When the untreated negative control did not differ statistically from the solvent-treated control (unpaired *t*-test; $p > .05$), these two groups were merged as a common control. When both controls differed statistically from each other (unpaired *t*-test; $p < .05$) the solvent control was used as the reference-control. For the endpoints gonadal cortex thickness and area of seminiferous tubules as well as for the endpoint gonad surface area data were normalized to the control. Data were analyzed using Fisher's exact test, one-way ANOVA with Dunnett's

Table 1
Embryonic mortality in untreated (NC) and solvent-treated (SC) controls.

		NC	SC
Σ experiments		15	15
Mortality (%) ^{a b}	0	53.3 (8)	20.0 (3)
	>0–10	6.67 (1)	0.00 (0)
	>10–20	40.0 (6)	33.3 (5)
	>20–30	0.00 (0)	33.3 (5)
	>30–40	0.00 (0)	0.00 (0)
	>40–50	0.00 (0)	6.67 (1)
	>50–60	0.00 (0)	6.67 (1)
Σ fertilized eggs		256	258
Sex-specific mortality (%) ^c	Σ males	46.9 (120)	43.4 (112)
	males vital	44.9 (115)	36.8 (95)
	males dead	1.95 (5)	6.59 (17)
	Σ females	50.0 (128)	47.6 (123)
	females vital	48.0 (123)	42.2 (109)
	females dead	1.95 (5)	5.43 (14)
	sex not verified ^d	3.13 (8)	8.91 (23)

^a Experiments were classified according to the percentage of mortality in the individual experiments (e.g. “>0–10” means a mortality rate between zero and ten percent).

^b The number in parentheses represents the number of experiments with a defined mortality rate.

^c The number in parentheses represents the number of affected embryos.

^d The phenotypic and genetic sex of these embryos could not be determined, because they died in an early developmental stage in which no reproductive organs were visible and no sufficient tissue sample were available for genetic sexing.

multiple comparison test (normal distribution of data) or Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test (no normal distribution of data) with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

3. Results

3.1. Baseline experiments in control groups

3.1.1. Embryonic mortality

The fertility rate in the individual experiments was at least 89% in both control groups. In the untreated control a maximum of 16% of embryos per experiment died. SC showed a higher variability of mortality up to 54%, whilst the majority of the experiments were in a range up to 25% mortality (Table 1). Mortality was significantly different between the two control groups ($p < .001$).

In both controls, the genetic sex matched 100% with the phenotypic sex, in males as well as in females. The sex ratio was balanced within both test groups, showing values around 1:1 for the total number of male and female embryos (Table 1). There was no indication for a sex-related effect of the solvent on mortality. In both control groups an equivalent proportion of embryos of both sexes died: 2% in the untreated control and around 6% in the solvent-treated control.

There was no correlation between the injection volume used for the SC and the mortality. Experiments performed with an injection volume of 60 μ L per egg showed no statistically significant increase in mortality compared with experiments performed with an injection volume of 15 μ L per egg.

3.1.2. Malformations

Observations of the different kinds of malformations were made on the treated embryos dying during the incubation period or stopped on embryonic day 19. In general, different types of malformations were noted in the same embryo. In the untreated control 3 of 256 embryos (1.17%) were malformed with a total number of 4 malformations. These malformations were exclusively found to be celosomia (75.0%) or affected the limbs (left wing; 25.0%). In the solvent-treated control 15 of 258 embryos (5.81%) were malformed with a total number of 22 malformations. These malformations mainly affected the eyes (left/right anophthalmia; 27.3%) often in

context with malformations of the beak (torsion of beak or atrophy of upper beak; 18.2%), celosomia (22.7%) and less often malformations of the limbs (legs/feet; 13.6%), edema and exencephalia (9.10%, respectively). Statistical analysis showed that the number of malformed embryos and the total number of individual malformations in the DMSO-treated control increased significantly compared to untreated embryos ($p < .01$ and $p < .001$, respectively). There was no difference in the rate of malformations between the different volumes of DMSO.

3.1.3. Morphological observation of the gonads – gonad surface area

The left and right gonads of male and female chicken embryos are positioned on the ventromedial surface of the respective mesonephros with the dorsal aorta between the gonads. In female embryos, the difference in size between left and right ovary was clearly evident on embryonic day 19. The left ovary was significantly larger and more differentiated than the right one. On average, the right ovary attained around 20% of the surface area of the left ovary in both control groups (Table 2).

In male embryos, the difference in size between left and right gonad was less prominent compared to females. Both testes were fully differentiated and had about the same size, although the left testis was slightly larger. On average, the right testis attained about 90% of the surface area of the left one for both control groups (Table 2).

Regarding the parameters surface area of left and right testis and ovary, little statistical deviations were detected when comparing the mean values in the control groups of the 15 individual experiments against each other or against the arithmetic means of the respective control group. This shows a high statistical contingency, i.e. a high portion of untreated or solvent-treated controls in individual experiments with no statistical difference compared to the other controls of the respective group or compared with the arithmetic mean value of the respective control group. Within the untreated and solvent-treated control group, at least 93% of the experiments showed no statistically significant differences from each other or from the arithmetic mean of the respective control group ($p > .05$) (Table 3). Between untreated and solvent-treated control group, at least 94% of the experiments showed no statistically significant differences from each other ($p > .05$) (Fig. 1 A, B and

Table 2

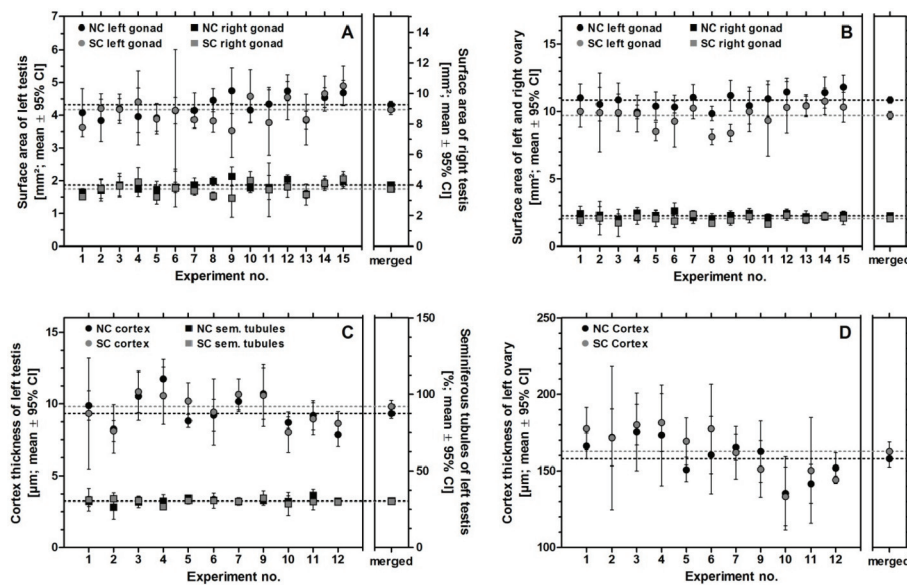
Gonad surface area, cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of untreated (NC) and solvent-treated (SC) chicken embryos on embryonic day 19.

Sex	Group	Gonad surface area			Cortex thickness [μm]	Seminiferous tubules [%]
		left [mm^2]	right [mm^2]	right/left [%]		
Male	NC	4.32 \pm 0.58	4.00 \pm 0.56 ^b	92.5 \pm 7.81 ^a	9.32 \pm 1.43	30.6 \pm 2.75
	SC	4.17 \pm 0.70	3.74 \pm 0.71 ^b	89.8 \pm 9.50 ^a	9.81 \pm 1.59	30.1 \pm 3.02
Female	NC	10.8 \pm 1.37 ^c	2.24 \pm 0.50 ^b	20.8 \pm 4.60	158 \pm 24.2	–
	SC	9.70 \pm 1.53 ^c	2.04 \pm 0.50 ^b	21.1 \pm 4.14	163 \pm 24.5	–

Statistical analysis by unpaired *t*-test. Identical superscripted letters indicate a significant difference (a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$; c: $p < 0.001$) between NC and SC.**Table 3**

Statistical consistency as the percentage of experiments with no statistically significant difference of the mean values of individual experiments within untreated (NC) and solvent-treated (SC) control groups compared with each other (all vs. all) or against the arithmetic mean of the respective control group (individual vs. arithmetic mean) or between NC and SC.

Sex	Endpoint	Consistency of individual experiments (%)					
		within NC		within SC		between NC and SC	
		all vs. all ^a	individual vs. arithmetic mean ^b	all vs. all ^a	individual vs. arithmetic mean ^b	all vs. all ^c	
Female	Surface area of left ovary	100%	100%	94%	93%	94%	
	Surface area of right ovary	100%	100%	100%	100%	100%	
	Cortex thickness	98%	100%	93%	91%	99%	
Male	Surface area of left testis	100%	100%	99%	93%	100%	
	Surface area of right testis	97%	93%	100%	100%	99%	
	Cortex thickness	78%	82%	100%	100%	93%	
	Seminiferous tubules	98%	91%	100%	100%	99%	

^a Statistical analysis by one-way ANOVA with Newman-Keuls post test. Comparison of all mean values of individual experiments within the respective control group.^b Statistical analysis by one-way ANOVA with Dunnett's post test. Comparison of all mean values of individual experiments with the arithmetic mean of the pooled control group.^c Statistical analysis by one-way ANOVA with Newman-Keuls post test. Comparison of all mean values of individual experiments between untreated and solvent-treated control group.**Fig. 1.** Surface area of left and right testis (A) and ovary (B), cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of left testis (C) and cortex thickness of left ovary (D) of embryos of the domestic fowl (*Gallus g. domesticus*) on embryonic day 19. Data points represent the mean \pm 95% confidence interval (95% CI) of untreated negative control (NC) and solvent-treated control (SC) in each single experiment; dashed lines and data points "merged" represent the arithmetic mean of all NC and SC data from the 15 (A, B) or 11 (C, D) experiments. Experiment no. 8 (C, D) was not considered, since the gonadal tissues were used for other examinations.**Table 3).**

Overall, the left and right gonads were slightly smaller in the solvent-treated control compared to the untreated control, for males as well as for females. In a predominant proportion of the experiments (left and right ovary: 100% and 87%, respectively; left and right testis: 53% and 67%, respectively) the means of the individual experiments of the untreated control were higher than those

of the solvent-treated control. This effect was found to be more pronounced in female gonads.

Comparing the gonad surface area of male and female gonads in the solvent-treated group, experiments that were performed with an injection volume of 60 μL per egg showed a statistically significant difference compared with experiments that were performed with an injection volume of 15 μL per egg for the area of the left

ovary ($p < .001$) and the area of the right testicle ($p < .05$). The surface area of these gonads decreased with increasing volume of the solvent.

3.1.4. Histological observation of the gonads – left testis and ovary

On day 19 of incubation the female left ovary showed a well-differentiated medulla and cortex, while the right ovary had only medulla tissue with an outer thin layer of flattened cells, comparable to the cortex of male testicles. The medulla of the left ovary was loosely arranged and crossed by lacunar channels. The left and right male testes were nearly identically sized, mirror-inverted formed and characterized by a thin cortex layer of 2–3 cells and interstitial space and seminiferous tubules in the medulla, representing the location of spermatogenesis in postnatal developmental stages.

As already shown for the endpoint gonad surface area in section 3.1.3, also the parameters cortex thickness of left testis and ovary and percentage of seminiferous tubules in the left testis exhibited a high statistical consistency when comparing the mean values of the 11 individual experiments against each other or against the arithmetic means of the respective control groups. Within untreated and solvent-treated control group, at least 78% of the experiments showed no statistically significant differences from each other or from the arithmetic means of the respective control group ($p > .05$) (Table 3). Between untreated and solvent-treated control groups, 93–99% of the experiments showed no statistically significant differences from each other ($p > .05$) (Fig. 1C, D and Table 3).

Comparing the histological endpoints in gonads of male and female embryos, experiments that were performed with a solvent volume of 60 μL showed no statistically significant increase compared with experiments that were performed with 15 μL of the solvent.

3.2. Effects of in ovo exposure to BPA and EE₂

3.2.1. Embryonic mortality

In the experiments investigating the effects of BPA and EE₂ the fertility rate of the individual treatment groups was $\geq 87\%$. The untreated control showed the lowest mortality of nearly 6%, the solvent control a mortality rate of nearly 20% (Table 4). With a decreasing concentration of BPA a rising mortality was observed, which was between 17% and 30%. Only in the test group receiving 75 μg BPA/g egg weight, which showed the highest mortality rate with 30%, the deviation from the solvent control was statistically significant ($p < .01$). The mortality in the test group receiving EE₂ was 23.4%. There were no statistical differences between the individual experiments of the respective treatment groups. There was also no indication that one of the sexes was more affected by substances treatment than the other.

The genetic sex ratio was balanced within all test groups, showing a proportion of males between 37% and 59%. In both controls, as well as in treatment groups receiving different concentrations of BPA, the genetic sex matched 100% with the phenotypic sex. The group receiving 20 ng EE₂/g egg showed a significantly increased number of embryos, which were determined as phenotypic females but identified as genetic males. Almost 90% of the genetic males (17 of 19 vital males) were identified as intersex-males with ovotestes. The right testes of the affected males were noticeably smaller than those of control males while left testes visibly changed in shape and structure.

3.2.2. Malformations

Different kinds of malformations were observed for all treated embryos dying during the incubation period or stopped on embryonic day 19. While no malformations could be found in the control groups, in the EE₂-treated group 2 of 47 embryos (4.26%) showed malformations which were found to be celosomia or exencephalus (50.0%, respectively). Taking all groups receiving different concentrations of BPA together, 8 of 143 embryos (5.59%; 75 μg BPA/g egg: 4 of 50 embryos (8.00%); 150 μg BPA/g egg: 2 of 46 embryos (4.35%); 300 μg BPA/g egg: 2 of 47 embryos (4.26%)) showed malformations which were found to be celosomia (50.0%), exencephalus (12.5%) or in general deformations of body or head (37.5%). Compared to the control, only the test group receiving 75 μg BPA/g egg weight showed an increase in the incidence of malformations ($p < .01$).

3.2.3. Morphological observations of the gonads - gonad surface area

The gonad surface area (Fig. 2 A Table 5) was especially influenced by EE₂, which caused a significant reduction of female right ovaries by about 26% and of male right testes by about 55%. Female left gonad surface areas significantly increased when treated with 75 μg BPA/g egg. Left and right gonad surface areas of males and right gonad surface areas of females of all groups receiving BPA did not differ statistically from the control. In females, the right ovary attained around 20% of the surface area of the left ovary with marginal differences between controls and treatment groups receiving EE₂ or BPA as well as between the different treatment groups. In males, the right testis of controls and treatment groups receiving different concentrations of BPA attained around 90% of the surface area of the left. Since the gonad surface area of the right testis was significantly decreased when treated with EE₂, the ratio of right to left testis was significantly reduced to 42% ($p < .001$). The gonad surface area of right testes of EE₂-treated males was similar to right ovaries in control groups. Although the surface area of left testes was only marginally changed by EE₂ affected testes showed a female-like shape and a well visible female-typical thickened

Table 4

Embryonic mortality after in ovo exposure to EE₂ (20 ng/g egg) and bisphenol A (75, 150 or 300 $\mu\text{g}/\text{g}$ egg).

	NC	SC	EE ₂	BPA 75	BPA 150	BPA 300
Σ fertilized eggs	66	41	47	50	46	47
Σ males	45.5% (30)	48.8% (20)	48.9% (23)	54.0% (27)	37.0% (17)	48.9% (23)
males vital	42.4% (28)	43.9% (18)	40.4% (19)	44.0% (22)	34.8% (16)	38.3% (18)
males dead	3.03% (2)	4.88% (2)	8.51% (4)	10.0% (5)	2.17% (1)	10.6% (5)
Σ females	54.5% (36)	51.2% (21)	46.8% (22)	42.0% (21)	58.7% (27)	51.1% (24)
females vital	51.5% (34)	36.6% (15)	36.2% (17)	26.0% (13)	43.5% (20)	44.7% (21)
females dead	1.52% (1)	14.6% (6)	10.6% (5)	16.0% (8)	15.2% (7)	6.38% (3)
sex not verified ^a	1.52% (1)	0.00% (0)	4.26% (2)	4.00% (2)	4.35% (2)	0.00% (0)

^a The phenotypic and genetic sex of these embryos could not be determined, because they died in an early developmental stage in which no reproductive organs were visible and no sufficient tissue sample were available for genetic sexing.

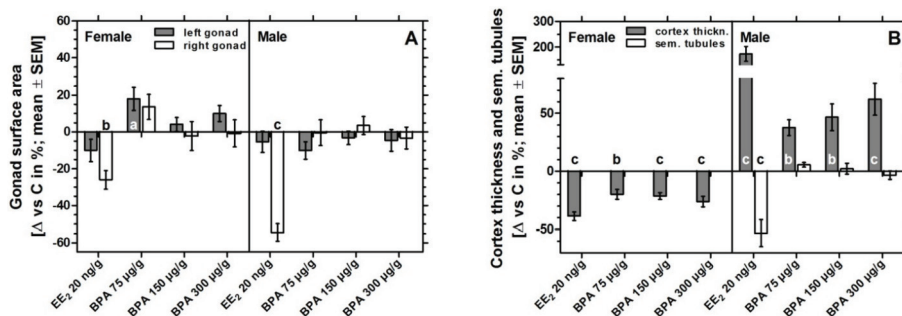


Fig. 2. Effects of in ovo exposure to bisphenol A (BPA) and 17 α -ethinylestradiol (EE₂) on left and right gonad surface area (A) and cortex thickness and percentage of seminiferous tubules (B) of embryos of the domestic fowl (*Gallus g. domesticus*) on embryonic day 19. Statistical analysis by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test (B) or Kruskal-Wallis test with Dunn's post test (A, B). Lowercase indicate significant differences compared to control. Level of significance: a: $p < .05$; b: $p < .01$; c: $p < .001$.

Table 5
Gonad surface area, cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of chicken embryos after in ovo exposure to EE₂ (20 ng/g egg) and bisphenol A (75, 150 or 300 μ g/g egg).

Sex	Group	Gonad surface area			Cortex thickness [μ m]	Seminiferous tubules [%]
		left [mm ²]	right [mm ²]	right/left [%]		
Male	NC	4.61 \pm 0.85	4.03 \pm 0.68	87.9 \pm 6.62	11.9 \pm 2.18	27.9 \pm 3.42
	SC	4.48 \pm 0.86	4.17 \pm 0.81	91.7 \pm 8.74	11.0 \pm 2.40	26.8 \pm 4.62
	C #	4.56 \pm 0.85	4.09 \pm 0.73	89.4 \pm 7.62	11.6 \pm 2.26	27.4 \pm 3.92
	EE ₂	4.31 \pm 1.11	1.86 \pm 0.83 ^c	42.0 \pm 19.3 ^c	31.6 \pm 11.1 ^c	12.8 \pm 10.0 ^c
	BPA 75	4.10 \pm 0.95	4.07 \pm 1.32	94.0 \pm 8.68	15.9 \pm 3.07 ^b	28.9 \pm 2.13
	BPA 150	4.41 \pm 0.66	4.23 \pm 0.80	95.9 \pm 10.7	17.0 \pm 4.44 ^b	28.0 \pm 3.83
	BPA 300	4.35 \pm 1.19	3.95 \pm 1.09	89.5 \pm 6.83	18.8 \pm 5.03 ^c	26.5 \pm 2.69
Female	NC	10.6 \pm 1.38 ^b	2.36 \pm 0.65	22.6 \pm 6.16	158 \pm 40.1	—
	SC	8.83 \pm 1.80	2.02 \pm 0.62	21.7 \pm 3.71	154 \pm 20.6	—
	C #	—	2.25 \pm 0.65	22.3 \pm 5.49	157 \pm 35.7	—
	EE ₂	7.94 \pm 2.29	1.67 \pm 0.47 ^b	22.3 \pm 8.90	95.8 \pm 26.1 ^c	—
	BPA 75	10.4 \pm 2.14 ^a	2.56 \pm 0.60	24.9 \pm 4.36	125 \pm 22.2 ^b	—
	BPA 150	9.19 \pm 1.50	2.20 \pm 0.79	23.6 \pm 6.73	123 \pm 18.1 ^c	—
	BPA 300	9.71 \pm 1.73	2.23 \pm 0.74	22.2 \pm 5.59	116 \pm 27.8 ^c	—

If NC and SC were not statistically different (unpaired *t*-test, $p > .05$), they were pooled to a merged control C and tested against the treatment-groups. If NC and SC were statistically different (unpaired *t*-test, $p < .05$), C was not calculated and treatment-groups were tested against SC. Statistical evaluation with One-way ANOVA and Dunnett's post test (female cortex thickness, male seminiferous tubules) or Kruskal-Wallis test with Dunn's post test (male cortex thickness, male and female gonad surface areas). Identical superscripted letters indicate as insignificant difference (a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$; c: $p < 0.001$) compared to the pooled control C or the solvent control SC.

translucent cortex region when viewed under a stereomicroscope.

3.2.4. Histological observations of the gonads – left testis and ovary

All concentrations of BPA as well as the single concentration of EE₂ resulted in a significant reduction of the cortex thickness of female left ovaries ($p < .01$ and $p < .001$; Fig. 2 B, Table 5). EE₂ differed by nearly 39% and BPA concentrations by up to about 26% from the control. Estrogen-mediated effects in females were found to be concentration-independent as differences between EE₂ and BPA or between the different concentrations of BPA were marginal. In contrast to females, the cortex thickness of male left gonads was significantly increased by the administration of BPA and EE₂. EE₂-related effects were markedly stronger than those of BPA. Compared to the control the male cortex thickness was increased by up to 62% in BPA-treated groups and by 173% in the EE₂-treated group. The BPA-related increase of male cortex thickness was found to be concentration dependent. In the affected cortices of both treatment groups, BPA and EE₂, dividing cells were found which resembled the female oogonia. Since the study of these cells was very complex due to the relatively narrow cortex thickness of male embryos this observation was not quantified. The percentage of seminiferous tubules in male left gonads, however, was affected by EE₂ alone. Compared to the control, EE₂-treatment resulted in a significant drop by about 53%. BPA concentrations differed marginally ($p > .05$) by up to 5.5%.

4. Discussion

The aim of our project is the further development of a standardized test protocol for the assessment of the effects of EDCs in chicken embryos. Therefore, the focus of the present study was on the systematic investigation of the variability of individual parameters in untreated and solvent-treated control groups to provide therefore an important basis for a further validation of the test. In a large number of experiments ($n = 15$), carried out over a period of 3 years, the natural variability of the test system was determined. By merging the data of the 15 experiments we also compared for differences inside and between untreated and solvent-treated control groups. We determined normal mortality rates and gonadal parameters of 19-days-old embryos to establish validity criteria for future standardized test series. In a second step, we investigated the effects of two model estrogens, BPA and EE₂, on developmental and gonadal endpoints to provide robust values for all parameters investigated and to show good reproducibility of the method. This is to demonstrate that the test method based on the chicken embryo is a suitable system for the detection of EDCs.

4.1. Embryonic mortality

It has been shown that the mortality of embryos from unmanipulated control eggs in the 15 baseline experiments was up to a

maximum of 16%. Based on the studies of Romanoff and Romanoff (1972), expected mortality in untreated embryos is about 20%. Comparable low mortality rates were also confirmed in other studies (Wyatt and Howarth, 1976; DeWitt et al., 2005a, 2005b). In comparison, mortality of solvent-treated embryos was below 25% in a predominant proportion of the 15 experiments while in two experiments more than 30% of embryos died, suggesting that DMSO induces an increased mortality compared to the untreated control. Our data indicate that a mortality of 30% in the solvent group as well as in the untreated group should be considered as validity criterion for a future test design.

In studies on avian development different carriers have been used, such as organic solvents, vegetable oil, just water or an emulsion. Each carrier with its special characteristics has its advantages and disadvantages. DMSO is used in a variety of experiments because of its solubility properties and good miscibility with other solvents. In toxicological studies and pharmacological screenings it is used to enhance the solubility of hydrophobic chemicals (Castro et al., 1995) but it may increase membrane permeability and substance uptake (Notman et al., 2006). Although a solvent such as DMSO is often inevitable care should be taken as an intrinsic toxicity of DMSO has been reported in chicken (Caujolle et al., 1967; Carew and Foss, 1972; Landauer and Salam, 1972; Morgan, 1974; Wyatt and Howarth, 1976) and various other organisms (Anderson et al., 2004; Chen et al., 2011; Galvao et al., 2014; Stevens et al., 2015). It has been shown that an increasing dose of the solvent is associated with an increase in mortality. Different studies indicate that higher injection volumes in general have harmful effects on developing chicken embryos, irrespective of the solvent used (Landauer and Salam, 1972; Morgan, 1974; Wyatt and Howarth, 1976; DeWitt et al., 2005b). However, it must be mentioned that also the day of application can affect embryonic mortality. Regarding the two volumes of DMSO (15 μ L, 60 μ L) used in the present study, there was no difference between the mortality in the individual developmental stages of the embryos. This suggests that even a higher volume of up to 60 μ L DMSO administered into the egg yolk of one day old embryos does not cause an increase in mortality compared to the lower volume of 15 μ L. However, based on our own data and the results of other studies mentioned above, the volume of the solvent used should not exceed 60 μ L. It is rather useful to keep the volume as low as possible to minimize toxic effects of the solvent. Nevertheless, the volume of the solvent is generally dependent on the chemicals to be dissolved therein and the concentration of the chemical.

In ovo-treatment of chicken embryos with BPA and EE₂ led to a slight increase in mortality as expected. Nevertheless, mortality rates of controls and treatment groups were below 30%, which is in a reasonable range since low mortality rates or, conversely, high survival rates result in a sufficient number of vital embryos for follow-up examinations of gonadal tissues. In the 4 individual experiments the mortality rates of the untreated control were below 14% and the mortality rates of the solvent control below 27% which is in the same range as baseline experiments. According to the proposed validity criteria, as derived from the baseline experiments, all 4 experiments investigating the effects of EE₂ and BPA can be considered as valid.

The natural sex ratio of *Gallus g. domesticus* varies around 50%. The genetic sex ratio in the baseline experiments was balanced within both control groups, in vital embryos as well as in dead embryos. The genetic sex agreed 100% with the phenotypic sex for both control groups. There was no indication that one of the sexes was more affected by the solvent than the other.

In ovo-treatment to 20 ng EE₂/g egg, however, resulted in a large number of embryos that were phenotypic females but found to be genetic males. The size of the right testis of the affected males was

noticeably decreased with the structural appearance of a right ovary. The left testis, although not changed in size, showed shape and structure of a left ovary. This indicates that already the visual evaluation of the gonads, together with the information about the genetic sex, can indicate possible influences of EDCs on sex differentiation in chicken embryos. From this it can be concluded that a more detailed examination of the gonads is potentially suitable to detect possible effects of EDCs.

4.2. Malformations

Baseline experiments with control groups show a malformation rate of 1.2% in unmanipulated embryos and 5.8% in solvent-treated embryos. Compared to the unmanipulated group the significant increase in the solvent-treated group indicates a slight teratogenic activity of DMSO. This finding is in line with the results of Dresser et al. (1992) who assessed the teratogenic activity of four solvents in the Frog Embryo Teratogenesis Assay with *Xenopus laevis* (FETAX) and reported DMSO to be the least toxic and teratogenic solvent examined. Caujolle et al. (1967) noted that spontaneous malformations may exist in the chicken embryo with an incidence of about 2% what coincides with the data shown here for the untreated control. However, Alsop (1919) and Byerly (1930) showed malformation rates around 6%. Although the number of malformed embryos in the solvent-treated control increased compared to the untreated control, the SC is in the same range as in the studies mentioned above.

Malformations in untreated embryos were exclusively found to be celosomia or malformations of the limbs. DMSO-treated embryos showed malformations which mainly affected the eyes (left/right anophthalmia) often in context with malformations of the beak (torsion of the beak or atrophy of the upper beak), celosomia and less often malformations of the limbs (legs/feet), edema or exencephalia. Byerly (1930) found different types of malformations in unmanipulated eggs of the white leghorn breed, e.g. terata of the eyes (mono-/microphthalmia) or the brain (exencephalia, hyperencephalia). The study of Caujolle et al. (1967) showed that the nature of spontaneous malformations in chicken embryos exhibits a common pattern: anophthalmia, crossed beak with or without anencephalia and celosomia but never malformations of the limbs. Furthermore, they found that a 50% solution of DMSO in 0.9% physiological saline caused malformations at doses approaching the LD₅₀ (10.3 mg/embryo at E3 or 12.2 mg/embryo at E4). The most typical DMSO-induced malformations of embryos treated at E3 were left anophthalmia and left torsion of the beak with reduction of the upper beak and only to very small extent malformations of the limbs. DMSO-treatment at E4 produced almost 26% malformed embryos and generally caused lesions of the limbs and in lower percentages malformations of the beak and the eyes, anurous embryos and celosomia. In the baseline experiments of the present study the malformations found in the solvent-treated group support the findings of Caujolle et al. (1967) although our percentage of malformed embryos is significantly lower. There was no difference in the rate of malformation between the DMSO-treated groups of different volumes suggesting that also a dosage of 60 μ L can be used without increasing the number of malformed embryos. A malformation rate of almost 6% appears to be acceptable, as there is a sufficient number of embryos remaining for subsequent histological examinations.

Analyzing the frequency of malformations in the 4 experiments investigating the effects of EDCs, malformations are found neither in the untreated control nor in the solvent-treated control while malformation rates in the BPA- and EE₂-treated groups are around 5%. The significant increase in the malformation rate of the substance-treated group receiving 75 μ g BPA/g egg compared to the

control has to be assumed as concentration-independent as higher concentrations of the estrogen show marginal differences. However, all values are still in the range of the reported spontaneous malformation rate in chicken embryos of about 2% (Caujolle et al., 1967) to around 6% (Alsop, 1919; Byerly, 1930). Also, the malformation rates of around 5% in the estrogen-treated groups are in the same range as the malformation rates of the solvent control in our baseline experiments. In this context, the incidence of malformations in the substance-treated groups can be considered as inconspicuous. However, almost all of the BPA- or EE₂-treated groups show a marginally increased incidence of celosomia, compared to the control. In addition, exencephalia are exclusively found in substance-treated groups, while the formation of edema is completely absent there. Various malformations have already been described, among them, for example, terata of the eyes, the beak, the brain or the formation of celosomia (Byerly, 1930; Caujolle et al., 1967). These terata largely coincide with the malformations found in the solvent- and substance-treated groups. Although the pattern of malformations from solvent-treated control to substance-treated groups is slightly shifted, there is no statistical evidence that treatment with BPA or EE₂ specifically favors particular terata or generally results in increased malformation rates. It can be concluded that in ovo-exposure to both estrogenic substances does not increase the rate of malformations.

4.3. Morphological observations of the gonads - gonad surface area

In the baseline experiments the treatment with DMSO results in reduced gonad surface areas in both sexes. This effect is more distinct in female than in male gonads, as untreated control and solvent control differ significantly from each other. The size ratio of right to left gonad, however, remains unaffected for female embryos. The solvent seems to affect the growth of the female gonads in some way. For male embryos treated with DMSO there is only a slight tendency of smaller left and right gonad surface areas and the ratio of left to right gonad differs marginally between untreated control and solvent control. The reason may be a growth-inhibiting effect caused by the low basic toxicity of the solvent. An alternative explanation is a possible endocrine-mediated effect of the solvent. This is supported by the fact that the effect on the surface area of the gonads is sex-specific with female embryos being more affected while the change in male embryos is marginal. The hypothesis of a solvent-induced influence on the endocrine system of organisms is supported by various studies. In their review about the effects of different OECD-recommended carrier solvents, Hutchinson et al. (2006) describe an influence of DMSO on the reproduction of different fish species and an impact on biomarkers of endocrine disruption. The results of Pawlowski et al. (2004a, 2004b) show that DMSO did not affect different reproduction-related endpoints such as spawning and biomarker response of the fathead minnow, but a distinct reduction in the mean egg production. Further studies demonstrate an inhibition of various cytochrome P450 enzymes by DMSO (Chauret et al., 1998; Hickman et al., 1998; Busby et al., 1999; Easterbrook et al., 2001). It is concluded that since these enzymes are involved in the metabolism of endogenous substances such as steroid hormones interactions with solvents can result in a change in circulating hormone concentrations with subsequent effects on reproductive functions. This probable DMSO effect cannot be excluded for the chicken embryo used in our experiments.

Furthermore, data show that the larger the volume of the solvent used, the smaller the gonad surface areas, which again leads to the point that the solvent volume should be kept as low as possible. Similar studies measuring reproductive endpoints or endocrine disrupter biomarker responses also propose a maximum solvent concentration for the testing of aquatic organisms (Hutchinson

et al., 2006).

As a consequence of this, in the testing of chemical substances, a comparison should always be drawn between untreated embryos and solvent-treated embryos in order not to over- or underestimate any possible influence of the solvent. The arithmetic means of the gonad surface area of male and female embryos found in the baseline experiments can serve as key values for future tests.

The phenotypic sex of birds can be determined by screening the sex organs. Along with the information about the genetic sex the endpoint gonad surface area indicates whether a test substance influences the differentiation of the sexes. In ovo-exposure of male and female chicken embryos to EE₂ causes a significant decrease in the surface area of right testis and ovary. This effect is more pronounced in males and although the left testis does not change significantly in size, it shows a completely different appearance as it develops into an ovotestis with a translucent cortex as is typical for the left ovary. On the contrary, BPA had marginal effects on the gonad surface area of male and female chicken embryos. Only the concentration of 75 µg BPA/g egg resulted in an increase of the female left gonad surface area, which was found to be concentration-independent. For chicken and quail it is known that substances with endocrine potential can induce morphological changes in the sex organs (Scheib, 1983; Berg et al., 1998, 1999, 2001a, 2001b; Matsushita et al., 2006; Razia et al., 2006). The knowledge about the change in the gonads in shape, size and structure leads to the conclusion that gonad-related endpoints are useful for the testing of potential endocrine active substances. Although BPA and EE₂ are both estrogens, their activity differs considerably (Metcalfe et al., 2001; Oehlmann et al., 2006). However, it was in our expectation that in the chicken egg test the observed effect profile is substance-specific as shown here. Nevertheless, we have successfully shown the suitability of the endpoint gonad surface area for the detection of endocrine potentials as already the low dosage of 20 ng EE₂/g egg causes a significant change in shape and size of male testes. As a next step it should be investigated whether further classes of EDCs such as androgens, anti-androgens and anti-estrogens are able to cause comparable effects in gonads of the chicken embryo regarding the focused endpoints. All in all the endpoint gonad surface area could help facilitate the screening of potential EDCs as possible effects can be detected easily. However, subsequent histopathological analysis of the gonads will then give a more detailed description of the effects of possible EDCs on sex organ development of chicken embryos.

4.4. Histological observation of the gonads – left testis and ovary

Gonad tissue-related endpoints appear to be useful in the investigation of endocrine compounds, because they specifically influence the differentiation of the sexes. Since this represents a system in which the chemical is in direct contact with the embryo throughout development, it is likely that any toxic or teratogenic effect will be readily observed. However, there is always the possibility that the chicken will not be a species susceptible to a particular compound, just as it has been shown that other commonly used species of animals do not respond to all chemicals in a similar manner. It is also possible for the chicken to be more sensitive to a chemical than other species. Finally, this technique may be applied also to the study of (over-)additive effects of chemicals. Through the detailed investigation of the untreated and solvent-treated controls, a reliable statement about substance-related deviations from these can be made.

In the baseline experiments there was a marginal tendency of an enhanced cortex thickness in the SC compared to the NC, for males as well as for females. Analogous to the endpoint gonad surface area, females tended to be more affected than males. The

percentage of seminiferous tubules was not affected by the solvent. For both sexes only a small percentage of the means of the individual experiments within a test group as well as between the individual experiments between NC and SC differed significantly from each other. It can be assumed that this deviation is within natural fluctuation and indicates a good reproducibility for the method used. Therefore, the arithmetic means of the endpoints cortex thickness and percentage of seminiferous tubules are proposed as key values for follow-up tests.

The role of natural hormones in gonadal differentiation of birds is still partly unknown. Their possible function may become clearer when the hormone level is artificially influenced, for example by in ovo application of EDCs that potentially interact with steroidogenic enzymes. It is known that synthetic hormones may induce irreversible malformations of the gonads in birds during embryonic development or can alter gender-related behavior later in life, whereas other, less potent EDCs may exert less severe and often reversible effects in the less sensitive adult stage (Adkins-Regan, 1990; Ottinger and Abdelnabi, 1997). Therefore, the chicken embryo appears as a suitable model for the study of early sexual development and the potential impact of EDCs.

Depending on their hormonal system, the response of male and female chicken embryos to certain substances or substance classes can be very different. In birds, the genetic male is homozygous (ZZ), while the genetic female is heterozygous (ZW). Initially, all embryos have the same basic sex, regardless of their genetic gender: they are designed as males. The differentiation in one of the sexes during embryonic development depends on the level of circulating steroid hormones. Without external influence the undifferentiated gonads of genetic males develop into testes. In genetic females the synthesis of P450 aromatase finally results in the production of estrogens (Kagami and Hanada, 1997) which is substantial for the formation of female sex organs.

The results of the experiments assessing the effects of in ovo exposure to BPA and EE₂ show that both estrogens cause a significant reduction of the female cortex thickness. In males both substances cause a significantly thickened cortex with oocyte-like cells and a female-like structure, which coincides with previously published studies (Berg et al., 1998, 1999, 2001a, 2001b). While BPA does not affect the percentage of seminiferous tubules in male gonads, testicular tissue of EE₂-treated embryos appears significantly altered with a visibly lower number and degree of differentiation of seminiferous tubules and female-typical structures as lacunae. Since there are marginal differences between untreated and solvent-treated control in the baseline experiments as well as in substance experiments, it can be concluded that the differentiation of cortex and seminiferous tubules is unaffected by the solvent in both sexes. Therefore, it can be assumed that the shown effects are substance-specific and do not originate from the solvent.

Comparing both estrogenic substances, EE₂-caused effects are much more pronounced than those of BPA indicating the higher estrogenic potency of EE₂. This coincides with the studies of Metcalfe et al. (2001) which rates EE₂ to be much more potent than BPA in the yeast estrogen screen and in experiments with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Various studies on domestic fowl (*Gallus g. domesticus*) and Japanese quail (*Coturnix japonica*) demonstrate the effective feminization of male embryos when treated with estrogens or estrogen-active EDCs (Romanoff, 1960; Scheib and Reysbrion, 1979; Wolff, 1979; Samsel et al., 1982; Sotonyi and Csaba, 1986; Etches and Kagami, 1997; Berg et al., 1998, 1999, 2001a, 2001b; Shibuya et al., 2004). While the left testis is formed into an ovotestis or ovary, the differentiation of the right testis is largely inhibited, resembling a right ovary. In contrast, the treatment of female embryos with estrogens showed fewer effects on gonad differentiation. Since the key enzyme P450arom is not

synthesized in male gonads (Ayers et al., 2013; Scheider et al., 2014), constitutional estrogen concentrations in testes are very low (Woods and Erton, 1978; Tanabe et al., 1979, 1983) and not sufficient to cause an effect. Though, for a short time during embryonic development the estrogen receptor is detectable in male gonads, which makes them basically vulnerable to estrogens (Gasc, 1980; Smith et al., 1997; Nakabayashi et al., 1998). The artificial presence of estrogen at this critical time point therefore causes the differentiation towards the phenotypically female sex. Therefore, male gonads are basically able to develop ovarian tissue, whereby the absence of estrogen is essential for the testes formation. Since the estrogen level in females is continuously high, the administration of additional estrogen such as EDCs does not affect gonadal differentiation as strongly as in males.

Our as well as other investigations (Berg et al., 1998, 1999, 2001a, 2001b) have shown that the gonad-related endpoints cortex thickness and percentage of seminiferous tubules reliably respond to the treatment with the model estrogens BPA and EE₂. Also we provide reference values for future experiments. As mentioned above the next step of our investigations will focus on whether these endpoints can display the effects of other classes of EDCs as androgens, anti-androgens and anti-estrogens.

5. Overall conclusions

The present study is part of a project aiming to improve a replacement method for testing hormonally active compounds in birds, where fertilized eggs of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) are used. In baseline experiments we focused on the investigation of untreated and solvent-treated control groups to study normal development of the embryos without exposure to EDCs. We examined developmental and gonadal endpoints and determined reliable reference values for each endpoint which can serve as validity criteria in future experiments. Both controls were easily reproducible with low variability within as well as between both control groups. Since solvent-related effects were low we recommend DMSO as solvent for subsequent experiments. In further experiments investigating the effects of two estrogenic EDCs, BPA and EE₂, we provided robust reference values for all endpoints which are suggested to serve as positive control values in future experiments. Overall, the chicken embryo has proven to be a suitable and reliable test system for the investigation of the effects on toxicology and reproductive tissues of various chemical substances. Based on these results the study of the effects of further substance classes as androgens, anti-androgens and anti-estrogens on sexual differentiation of the chicken embryo is very promising.

6. Declarations

Conflict of interest

None.

Funding

This work was carried out in the framework of the project GenOvotox II, funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF; project no 031A104B).

Acknowledgements

We thank Andrea Misovic, Simone Ziebart, Rebecca Lenz, Fabian Massing, Alina Helmes and Katrin Collmar for technical assistance.

References

- Adkins-Regan, E., 1990. Hormonal Basis of Sexual Differentiation in Birds. Hormones, Brain and Behavior in Vertebrates, vol. 8. Karger, Basel, pp. 1–14.
- Alsop, F.M., 1919. The effect of abnormal temperatures upon the developing nervous system in the chick embryos. *Anat. Rec.* 15 (6), 306–331.
- Anderson, G.L., Cole, R.D., Williams, P.L., 2004. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (5), 1235–1240.
- Ayers, K.L., Sinclair, A.H., Smith, C.A., 2013. The molecular genetics of ovarian differentiation in the avian model. *Sexual Development* 7 (1–3), 80–94.
- Berg, C., Halldin, K., Brunstrom, B., Brandt, I., 1998. Methods for studying xenoestrogenic effects in birds. *Toxicol. Lett.* 103, 671–676.
- Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, A.K., Brandt, I., Brunstrom, B., 1999. The avian egg as a test system for endocrine disruptors: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Sci. Total Environ.* 233 (1–3), 57–66.
- Berg, C., Holm, L., Brandt, I., Brunstrom, B., 2001a. Anatomical and histological changes in the oviducts of Japanese quail, *Coturnix japonica*, after embryonic exposure to ethynylestradiol. *Reproduction* 121 (1), 155–165.
- Berg, C., Halldin, K., Brunstrom, B., 2001b. Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (12), 2836–2840.
- Berg, C., Blomqvist, A., Holm, L., Brandt, I., Brunstrom, B., Ridderstrale, Y., 2004. Embryonic exposure to oestrogen causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Reproduction* 128 (4), 455–461.
- Berge, J.A., Brevik, E.M., Bjorge, A., Folsvik, N., Gabrielsen, G.W., Wolkers, H., 2004. Organotins in marine mammals and seabirds from Norwegian territory. *J. Environ. Monit.* 6 (2), 108–112.
- Biau, S., Bayle, S., Barbara, P.D., Roig, B., 2007. The chick embryo: an animal model for detection of the effects of hormonal compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (4), 1397–1403.
- Birceanu, O., Servos, M.R., Vijayan, M.M., 2015. Bisphenol A accumulation in eggs disrupts the endocrine regulation of growth in rainbow trout larvae. *Aquat. Toxicol.* 161, 51–60.
- BMELV, 2015. Tables of German Animal Experiments in 2013. In: http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/Versuchstierdaten2015.pdf?__blob=publicationFile.
- Brunstrom, B., Halldin, K., 2000. Ecotoxicological risk assessment of environmental pollutants in the Arctic. *Toxicol. Lett.* 112–113, 111–118.
- Busby, W.F., Ackermann, J.M., Crespi, C.L., 1999. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metabol. Dispos.* 27 (2), 246–249.
- Byerly, T.C., 1930. The effects of breed on the growth of the chick embryo. *J. Morphol.* 50 (2), 341–359.
- Carere, C., Balthazart, J., 2007. Sexual versus individual differentiation: the controversial role of avian maternal hormones. *Trends Endocrinol. Metabol.* 18 (2), 73–80.
- Carew, L.B., Foss, D.C., 1972. Tolerance of chicks for dimethyl sulfoxide. *Poultry Sci.* 51 (1), 206–211.
- Castro, C.A., Hogan, J.B., Benson, K.A., Shehata, C.W., Landauer, M.R., 1995. Behavioral-effects of vehicles - DMSO, ethanol, TWEEN-20, TWEEN-80, and EMULPHOR-620. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50 (4), 521–526.
- Caujolle, F.M., Caujolle, D.H., Cros, S.B., Calvet, M.M.J., 1967. Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141 (A1), 110–126.
- Chauret, N., Gauthier, A., Nicoll-Griffith, D.A., 1998. Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metabol. Dispos.* 26 (1), 1–4.
- Chen, T.-H., Wang, Y.-H., Wu, Y.-H., 2011. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquat. Toxicol.* 102 (3–4), 162–166.
- Colborn, T., Saal, F.S.V., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101 (5), 378–384.
- Cook, J.C., Kaplan, A.M., Davis, L.G., Oconnor, J.C., 1997. Development of a tier I screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26 (1), 60–68.
- Davies, I.M., Harding, M.J.C., Bailey, S.K., Shanks, A.M., Lange, R., 1997. Sublethal effects of tributyltin oxide on the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158, 191–204.
- DeWitt, J.C., Meyer, E.B., Henshel, D.S., 2005a. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48 (2), 270–277.
- DeWitt, J.C., Meyer, E.B., Henshel, D.S., 2005b. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of vehicle volume. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48 (2), 260–269.
- Dresser, T.H., Rivera, E.R., Hoffmann, F.J., Finch, R.A., 1992. Teratogenic assessment of 4 solvents using the Frog embryo Teratogenesis assay - Xenopus (FETAX). *J. Appl. Toxicol.* 12 (1), 49–56.
- Easterbrook, J., Lu, C., Sakai, Y., Li, A.P., 2001. Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metabol. Dispos.* 29 (2), 141–144.
- Etches, R., Kagami, H., 1997. Genotypic and phenotypic sex reversal. In: Harvey, S., Etches, R.J. (Eds.), *Perspectives in Avian Endocrinology*. Journal of Endocrinology Ltd, Bristol, pp. 57–67.
- Fridolfsson, A.K., Ellegren, H., 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avian Biol.* 30 (1), 116–121.
- Fry, D.M., Toone, C.K., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213 (4510), 922–924.
- Fry, D.M., 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial-chemicals. *Environ. Health Perspect.* 103, 165–171.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R., Cordeiro, M.F., 2014. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *Faseb. J.* 28 (3), 1317–1330.
- Gasc, J.M., 1980. Estrogen target-cells in gonads of the chicken-embryo during sexual-differentiation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 55 (FEB), 331–342.
- Giesy, J.P., Feyk, L.A., Jones, P.D., Kannan, K., Sanderson, T., 2003. Review of the effects of endocrine-disrupting chemicals in birds. *Pure Appl. Chem.* 75 (11–12), 2287–2303.
- Gooding, M.P., Wilson, V.S., Folmar, L.C., Marcovich, D.T., LeBlanc, G.A., 2003. The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environ. Health Perspect.* 111 (4), 426–430.
- Green, J., Wheeler, J.R., 2013. The use of carrier solvents in regulatory aquatic toxicology testing: practical, statistical and regulatory considerations. *Aquat. Toxicol.* 144, 242–249.
- Grote, K., Stahlschmidt, B., Talsness, C.E., Gericke, C., Appel, K.E., Chahoud, I., 2004. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology* 202 (3), 145–158.
- Halldin, K., Holm, L., Ridderstrale, Y., Brunstrom, B., 2003. Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in ovo exposure to o,p'-DDT. *Arch. Toxicol.* 77 (2), 116–122.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick-embryo (reprinted from *Journal of Morphology*, Vol. 88, 1951). *Dev. Dynam.* 195 (4), 231–272.
- Hickman, D., Wang, J.P., Wang, Y., Unadkat, J.D., 1998. Evaluation of the selectivity of in vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metabol. Dispos.* 26 (3), 207–215.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 76 (1), 69–92.
- Kagami, H., Hanada, H., 1997. Current knowledge of sexual differentiation in domestic fowl. *World Poultry Sci. J.* 53 (2), 111–123.
- Kamata, R., Takahashi, S., Shimizu, A., Shiraishi, F., 2006. Avian transgenerational reproductive toxicity test with in ovo exposure. *Arch. Toxicol.* 80 (12), 846–856.
- Keibel, F., Abraham, K., 1900. *Normentafel zur Entwicklungsgeschichte des Huhnes*. Fischer, Gallus domesticus. Jena.
- Lan, N.C., Katzenellenbogen, B.S., 1976. Temporal relationships between hormone receptor-binding and biological responses in uterus - studies with short-acting and long-acting derivatives of estril. *Endocrinology* 98 (1), 220–227.
- Landauer, W., Salam, N., 1972. Aspects of dimethyl sulfoxide as solvent for teratogens. *Dev. Biol.* 28 (1), 35–46.
- Lange, I.G., Hartel, A., Meyer, H.H.D., 2002. Evolution of oestrogen functions in vertebrates. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83 (1–5), 219–226.
- Mallozzi, M., Bordin, G., Garo, C., Caserta, D., 2016. The effect of maternal exposure to endocrine disrupting chemicals on fetal and neonatal development: a review on the major concerns. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today - Rev.* 108 (3), 224–242.
- Matsushita, S., Yamashita, J., Iwasawa, T., Tomita, T., Ikeda, M., 2006. Effects of in ovo exposure to imazalil and atrazine on sexual differentiation in chick gonads. *Poultry Sci.* 85 (9), 1641–1647.
- McAllister, B.G., Kime, D.E., 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 65 (3), 309–316.
- Metcalfe, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koenig, B.G., Khan, C., Hughes, R.J., Croley, T.R., March, R.E., Potter, T., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2), 297–308.
- Morgan, W., 1974. Toxic effect of a radioprotectant (DMSO) on young chicken embryos. *Poultry Sci.* 53 (5), 1958.
- Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T., Mizuno, S., 1998. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J. Mol. Endocrinol.* 20 (2), 193–202.
- Notman, R., Noro, M., O'Malley, B., Anwar, J., 2006. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (43), 13982–13983.
- OECD, 1984. Test No. 206: Avian Reproduction Test. OECD Publishing.
- OECD, 2007. Test No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents. OECD Publishing.
- OECD, 2009. Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats. OECD Publishing.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Bachmann, J., Oetken, M., Lutz, I., Kloas, W., Ternes, T.A., 2006. Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda : prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environ. Health Perspect.* 114, 127–133.
- Oshima, A., Yamashita, R., Nakamura, K., Wada, M., Shibuya, K., 2012. In ovo exposure to nonylphenol and bisphenol A resulted in dose-independent

- feminization of male gonads in Japanese quail (*Coturnix japonica*) embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (5), 1091–1097.
- Ottinger, M.A., Abdelnabi, M.A., 1997. Neuroendocrine systems and avian sexual differentiation. *Am. Zool.* 37 (6), 514–523.
- Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J.A., Tyler, C.R., Braunbeck, T., 2004a. Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17- α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquat. Toxicol.* 68 (3), 277–291.
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C.R., Braunbeck, T., 2004b. Effects of 17- α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57 (3), 330–345.
- Pettersson, I., Arukwe, A., Lundstedt-Enkel, K., Mortensen, A.S., Berg, C., 2006. Persistent sex-reversal and oviductal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethinylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 79 (4), 356–365.
- Razia, S., Maegawa, Y., Tamotsu, S., Oishi, T., 2006. Histological changes in immune and endocrine organs of quail embryos: exposure to estrogen and nonylphenol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65 (3), 364–371.
- Romanoff, A.L., 1960. *The Avian Embryo: Structural and Functional Development*. Macmillan, New York.
- Romanoff, A.L., Romanoff, A.J., 1972. *Pathogenesis of the Avian Embryo - an Analysis of Causes of Malformations and Prenatal Death*. Wiley, New York.
- Russel, W.M.S., Burch, R.L., 1959, reprinted 1992. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Wheathamptonstead, England: Methuen.
- Samsel, J., Zeis, A., Weniger, J.P., 1982. Feminization in the chick-embryo testis by diethylstilbestrol and antagonizing action of tamoxifen. *Biochimie* 64 (5), 369–376.
- Scheib, D., Baulieu, E.E., 1981. Inhibiting effects of tamoxifen on the female differentiation of the gonads of quail embryos. *Comptes Rendus Seances Acad. Sci. Ser. III - Sci. Vie* 294 (7), 513–518.
- Scheib, D., 1983. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* 23, 87–92.
- Scheib, D., Reyssbrion, M., 1979. Feminization of the quail by early diethylstilbestrol treatment - histoenzymological investigations on steroid dehydrogenases in the gonads. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale* 68 (2), 85–98.
- Scheider, J., Afonso-Grunz, F., Hoffmeier, K., Horres, R., Groher, F., Rycak, L., Oehlmann, J., Winter, P., 2014. Gene expression of chicken gonads is sex- and side-specific. *Sexual Development* 8 (4), 178–191.
- Shibuya, K., Mizutani, M., Wada, M., Sato, K., Nunoya, T., 2004. A new screening model using F1 (AWE x WE) Japanese quail embryo for evaluating sex reversal effects. *J. Toxicol. Pathol.* 17 (4), 245–252.
- Smith, C.A., Andrews, J.E., Sinclair, A.H., 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. (vol 60, pg 295, 1997). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62 (4), 361.
- Sotonyi, P.T., Csaba, G., 1986. Effect of prenatal and or neonatal diethylstilbestrol (DES) or allylestrenol (AE) treatment on the postnatal-development of the chicken ovary. *Acta Biol. Hung.* 37 (3–4), 189–196.
- Starck, M., Ricklefs, R., 1997. *Avian Growth and Development: Evolution within the Altricial-precocial Spectrum*, vol. 1. Oxford University Press, Oxford.
- Stevens, A.-S., Pirote, N., Plusquin, M., Willems, M., Neyens, T., Artois, T., Smeets, K., 2015. Toxicity profiles and solvent-toxicant interference in the planarian *Schmidtea mediterranea* after dimethylsulfoxide (DMSO) exposure. *J. Appl. Toxicol.* 35 (3), 319–326.
- Tanabe, Y., Nakamura, T., Fujioka, K., Doi, O., 1979. Production and secretion of sex steroid-hormones by the testes, the ovary, and the adrenal-glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 39 (1), 26–33.
- Tanabe, Y., Yano, T., Nakamura, T., 1983. Steroid-hormone synthesis and secretion by testes, ovary, and adrenals of embryonic and post-embryonic ducks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 49 (1), 144–153.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33 (3), 378–455.
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001. Chronic exposure to 17- α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera : chironomidae). *Aquat. Toxicol.* 55 (1–2), 113–124.
- Wolff, E., 1979. Old experiments and new trends in avian sex differentiation. *Vitro Cell Dev. Biol.: J. Tech. Coun. ASCE* 15 (1), 6–10.
- Woods, J.E., Erton, L.H., 1978. Synthesis of estrogens in the gonads of the chick-embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36 (3), 360–370.
- Wyatt, R.D., Howarth, B., 1976. Effect of dimethyl-sulfoxide on embryonic survival and subsequent chick performance. *Poultry Sci.* 55 (2), 579–582.
- Zhang, J.L., Zuo, Z.H., Chen, Y.X., Zhao, Y., Hu, S., Wang, C.G., 2007. Effect of tributyltin on the development of ovary in female cuvier (*Sebastes marmoratus*). *Aquat. Toxicol.* 83 (3), 174–179.

A.2 Effects of estrogens and antiestrogens on gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*)

Luzie Jessl, Rebecca Lenz, Fabian G. Massing, Jessica Scheider, Jörg Oehlmann

Erschienen in:

PeerJ

Volume: 6 (2018)

Artikel-Nr.: 5094

Erklärung zu den Autorenteilen an der Publikation: Effects of estrogens and antiestrogens on gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*)

Status: publiziert

Name der Zeitschrift: PeerJ (Volume 6 (2018), Artikel-Nr.: 5094)

Beteiligte Autoren: Luzie Jessl (LJ), Rebecca Lenz (RL), Fabian G. Massing (FM), Jessica Scheider (JS), Jörg Oehlmann (JO)

Was hat die Promovierende bzw. was haben die Co-Autoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierende LJ:	55%
Co-Autor JS:	10%
Co-Autor JO:	25%
Co-Autor RL:	5%
Co-Autor FM:	5%

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierende LJ:	60% (Injektion, Bebrütung, Gonadenisolation, Histologie)
Co-Autor RL:	20% (Injektion, Bebrütung, Gonadenisolation, Histologie)
Co-Autor FM:	20% (Injektion, Bebrütung, Gonadenisolation, Histologie)

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierende LJ:	80% (Aufarbeitung aller Rohdaten, Erstellung von Abbildungen)
Co-Autor JS:	10% (Aufarbeitung aller Rohdaten)
Co-Autor RL:	5% (Aufarbeitung der Histologie-Rohdaten)
Co-Autor FM:	5% (Aufarbeitung der Histologie-Rohdaten)

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierende LJ:	65% (Interpretation und Analyse, Publikationsrecherche)
Co-Autor JS:	10% (Interpretation und Analyse)
Co-Autor JO:	5% (Interpretation und Analyse)
Co-Autor RL:	10% (Interpretation und Analyse)
Co-Autor FM:	10% (Interpretation und Analyse)

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierende LJ:	80%
Co-Autor JS:	10%
Co-Autor JO:	10%



Effects of estrogens and antiestrogens on gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*)

Luzie Jessl^{1,2}, Rebecca Lenz^{1,3}, Fabian G. Massing^{1,4}, Jessica Scheider¹ and Jörg Oehlmann¹

¹ Department Aquatic Ecotoxicology, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main, Hesse, Germany

² R-Biopharm AG, Darmstadt, Hesse, Germany

³ Dr. Drexler + Dr. Fecher GmbH, Groß-Umstadt, Hesse, Germany

⁴ ERM GmbH, Neu-Isenburg, Hesse, Germany

ABSTRACT

Since it is known that environmental contaminants have the potential to cause endocrine disorders in humans and animals, there is an urgent need for in vivo tests to assess possible effects of these endocrine disrupting chemicals (EDCs). Although there is no standardized guideline, the avian embryo has proven to be particularly promising as it responds sensitively to a number of EDCs preferentially impacting the reproductive axis. In the present study we examined the effects of in ovo exposure to fulvestrant and tamoxifen as antiestrogenic model compounds and co-exposure to both substances and the potent estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE₂) regarding sex differentiation and embryonic development of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). The substances were injected into the yolk of fertilized eggs on embryonic day 1. On embryonic day 19 sex genotype and phenotype were determined, followed by gross morphological and histological examination of the gonads. Sole EE₂-treatment (20 ng/g egg) particularly affected male gonads and resulted in an increased formation of female-like gonadal cortex tissue and a reduction of seminiferous tubules. In ovo exposure to tamoxifen (0.1/1/10 μ g/g egg) strongly impaired the differentiation of female gonads, led to a significant size reduction of the left ovary and induced malformations of the ovarian cortex, while fulvestrant (0.1/1/10 μ g/g egg) did not affect sexual differentiation. However, both antiestrogens were able to antagonize the feminizing effects of EE₂ in genetic males when administered simultaneously. Since both estrogens and antiestrogens induce concentration-dependent morphological alterations of the sex organs, the chick embryo can be regarded as a promising model for the identification of chemicals with estrogenic and antiestrogenic activity.

Submitted 16 February 2018

Accepted 5 June 2018

Published 3 July 2018

Corresponding author

Luzie Jessl, jessl@bio.uni-frankfurt.de

Academic editor

Todd Anderson

Additional Information and
Declarations can be found on
page 18

DOI 10.7717/peerj.5094

© Copyright
2018 Jessl et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Subjects Histology, Ecotoxicology

Keywords Gonad, Chicken embryo, Estrogen, Fulvestrant, Sex differentiation, Antiestrogen, 17 α -ethinylestradiol, Tamoxifen, Endocrine disruption

INTRODUCTION

In recent decades, reproductive disorders in animals and humans and the potential role of chemical substances that are suspected to cause these effects through their endocrine potential became of great interest for science and society. These so-called endocrine disrupting chemicals (EDCs) may alter sex-differentiation and reproduction by very different modes of action. If a chemical substance has the same effects as endogenous sex hormones at the estrogen or androgen receptor, this substance acts as an agonist and its effects are referred to as estrogenic or androgenic. On the contrary it is referred to as antiestrogenic or antiandrogenic when it inhibits the action of endogenous sex hormones as an antagonist at the corresponding steroid receptor. In view of the large number of constantly used chemicals, it is expected that potential EDCs end up in the environment and may affect humans and animals. These chemicals can originate from agriculture or industry, or may be used as pharmaceuticals. In the study of steroidal and non-steroidal substances, e.g., bisphenol A (BPA), 17α -ethinylestradiol (EE_2), tributyltin (TBT) and many more, hormonal effects on different groups of organisms have already been identified (*Peakall & Lincer, 1996; Berg et al., 1998; Berg et al., 1999; Watts, Pascoe & Carroll, 2001; Grote et al., 2004; Berg & Pettersson, 2006; Oehlmann et al., 2006; Pettersson et al., 2006; Ahn et al., 2007; Choi et al., 2007; Bodiguel et al., 2009; Scheider et al., 2018; Jessl, Scheider & Oehlmann, 2018*). These studies underline the assumption that numerous chemicals have an endocrine potential and may pose a potential threat to the ecosystem and to animal and human health.

In order to assess possible effects and to weigh risks, the testing of chemicals for their endocrine potential is of great importance. So far only a small fraction of the circulating and constantly used chemicals have been tested for a potential effect on the hormonal system. According to REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) further chemicals are to be tested for their harmful potential in Europe. To implement this, a variety of animal experiments have to be executed. For the testing of androgenic and estrogenic EDCs two rodent-based tests, the Hershberger assay (*OECD, 2009*) and the uterotrophic assay (*OECD, 2007*), have been internationally standardized. Since mainly juvenile or adult animals with full pain perception are used, the search for a suitable animal replacement system is of great importance. In addition, the developing embryo, which is regarded as the most sensitive stage of life and thus a special subject of protection, is insufficiently considered for the testing of chemicals. Since its development is particularly vulnerable to environmental influences including chemicals, the testing of embryos can unfold possible effects of these substances that may not be detected in adult individuals (*Duis et al., 2014*).

Beside developmental stages of other animal taxa, avian embryos have been used for a long time to study sexual development and the potential impact of environmental pollutants, including EDCs (*Fry & Toone, 1981; Berg et al., 1998; Eising et al., 2001; Berge et al., 2004; Biau et al., 2007*). One advantage of working with fertile eggs is that the application of substances, often injected directly into the egg, allows the use of specific and standardized dosages (*Berg et al., 1999*). As the hen affects the development of its offspring

by transferred genetic materials and hormones (*Carere & Balthazart, 2007*), substances incorporated by the mother may consequently also influence the development of the offspring even originally or as metabolites in the allantoic fluid (*Kamata et al., 2006*). However, in contrast to developing mammals or aquatic species, the chicken egg is a largely closed system lacking significant exchange with its external environment except for the interchange of gases. However, it should be noted that beyond gas exchange there is still a potential of interaction with the external environment since the embryo is sensitive to changes in temperature and humidity. In addition, the passage of metals (*Ackerman et al., 2016*) and highly lipophilic organic compounds (*Bargar, Scott & Cobb, 2001; Zheng et al., 2014*) from mother to offspring has been demonstrated. Thus, one injection of a test compound results in chronic chemical exposure, because no exchange or loss of the substance is possible except for metabolization, protein bonding or further modifications of the substance by the internal embryo environment. A single injection may therefore be sufficient to influence the developing embryo (*Davies et al., 1997; Gooding et al., 2003; McAllister & Kime, 2003; Zhang et al., 2007; Scheider et al., 2018; Jessl, Scheider & Oehlmann, 2018*).

It is already known that the exposure to xenobiotics during avian embryonic development may cause irreversible malformations of the sex organs and a disruption of gender-specific behavior in adult animals (*Adkins-Regan, 1990; Ottinger & Abdelnabi, 1997*). The embryo of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) is particularly suitable for our experiments as its developmental stages are fully described (*Keibel & Abraham, 1900; Hamburger & Hamilton, 1992; Starck & Ricklefs, 1997*). However, there is still no standardized procedure for experiments with chicken embryos available.

The present study is part of a project aiming to expedite a protocol to assess the potential effect of EDCs on early sexual differentiation in the chicken embryo. As part of this effort we analyzed the effects of different estrogenic and antiestrogenic compounds on embryonic development with special focus on potential gross morphological and histological changes of the gonads. EE₂, a synthetic hormone primarily used for contraception was selected for the study of estrogenic substances and was used as a positive substance. It has already been widely used in the study of EDCs and has shown to affect sexual differentiation in bird embryos (*Berg et al., 1998; Berg et al., 1999; Berg et al., 2001; Berg et al., 2004; Akazome & Mori, 1999; Watts, Pascoe & Carroll, 2001; Watts, Pascoe & Carroll, 2003; Berg & Pettersson, 2006; Pettersson et al., 2006; Biau et al., 2007; Brunstrom et al., 2009; Scheider et al., 2018; Jessl, Scheider & Oehlmann, 2018*). For the testing of antiestrogenic substances tamoxifen and fulvestrant, two well-known drugs with desired hormonal action were selected. Both compounds are used for the first-line endocrine therapy of estrogen receptor-positive metastatic breast cancer (*Henderson, 1991; Buzdar, 2001; Buzdar & Robertson, 2006*). Furthermore, both have been used for the testing of potential effects on different non-target organisms including the bird embryo (*Scheib & Baulieu, 1981; Cevalco et al., 2008; Sun, Zha & Wang, 2009; Hoffmann & Kloas, 2012; Yu et al., 2014*).

Table 1 Mortality (%) and malformations (%) in chicken embryos after in ovo exposure to fulvestrant (Ful, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/g}$ egg) and EE₂ (20 ng/g egg) or co-exposure to all concentrations of fulvestrant and EE₂.

Test substance \sum experiments \sum eggs	Fulvestrant			
	1 200			
Group	\sum eggs	\sum fertilized eggs	Mortality (%) ^a	Malformations (%) ^a
NC	24	22	18.2 (4)	0.00 (0)
SC	22	20	15.0 (3)	0.00 (0)
Ful 0.1	22	19	26.3 (5)	10.5 (2)
Ful 1	22	22	22.7 (5)	4.55 (1)
Ful 10	22	19	31.6 (6)	5.26 (1)
EE ₂	22	22	45.5 (10)	4.55 (1)
Ful 0.1 + EE ₂	22	20	35.0 (7)	10.0 (2)
Ful 1 + EE ₂	22	22	18.2 (4)	4.55 (1)
Ful 10 + EE ₂	22	18	33.3 (6)	11.1 (2)

Notes.

^aThe number in parentheses represents the number of affected embryos.

NC, untreated control; SC, solvent control.

MATERIALS AND METHODS

Dosing

All experiments were carried out with respect for the principles of laboratory animal care, in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the German Animal Welfare Act. Fertilized eggs of white Leghorn (*G. domesticus*) were obtained from a local breeder (LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetrieb, Dieburg, Germany). The total number of eggs per experiment and treatment-group are shown in Table 1 for fulvestrant and Table 2 for tamoxifen, including the treatment-groups with parallel sole and co-exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE₂). The testing of tamoxifen was conducted in a series of four experiments while fulvestrant was tested in a single experiment. Tamoxifen was tested in four experiments to ensure a higher degree of replication for an up to then not tested class of EDCs with unknown effects. The eggs were incubated at 37.5 ± 0.5 °C and $60 \pm 10\%$ relative humidity and turned over eight times a day in a fully automated incubator (J. Hemel Brutgeräte, Verl, Germany).

Fulvestrant (CAS: 129453-61-8; purity: $\geq 98\%$), tamoxifen (CAS: 10540-29-1; purity: $\geq 99\%$) and EE₂ (CAS: 57-63-6; purity: $\geq 98\%$) were purchased from Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, Germany). Fulvestrant (applied doses: 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/g}$ egg), tamoxifen (applied doses: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/g}$ egg) and EE₂ (applied dose: 20 ng/g egg) were dissolved alone or in combination in 60 μL of the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO; CAS: 67-68-5; purity: 99.5%; Applichem, Darmstadt, Germany). Eggs were yolk-injected on day 1 of incubation and further processed until dissection as described elsewhere (Jessl, Scheider & Oehlmann, 2018).

Table 2 Mortality (%) and malformations (%) in chicken embryos after in ovo exposure to tamoxifen (Tam, 0, 1, 1, 10 $\mu\text{g/g}$ egg) and EE₂ (20 ng/g egg) or co-exposure to all concentrations of tamoxifen (plus 0.001, 0.01 $\mu\text{g/g}$ egg) and EE₂.

Group	\sum eggs	\sum fertilized eggs	Test substance	Tamoxifen	
			\sum experiments	4	
			\sum eggs	603	
				Mortality (%) ^a	
				Malformations (%) ^a	
NC	93	88		7.95 (7)	0.00 (0)
SC	83	75		28.0 (21)	5.33 (4)
Tam 0.1	60	53		43.4 (23)	5.66 (3)
Tam 1	60	51		39.2 (20)	1.96 (1)
Tam 10	59	52		55.8 (29)	1.92 (1)
EE ₂	47	45		24.4 (11)	6.67 (3)
Tam 0.001 + EE ₂	30	28		7.14 (2)	7.14 (2)
Tam 0.01 + EE ₂	31	30		20.0 (6)	3.33 (1)
Tam 0.1 + EE ₂	46	44		34.1 (15)	4.54 (2)
Tam 1 + EE ₂	47	45		40.0 (18)	4.44 (2)
Tam 10 + EE ₂	47	43		30.2 (13)	6.98 (3)

Notes.

^aThe number in parentheses represents the number of affected embryos.

NC, untreated control; SC, solvent control.

Dissection, tissue preparation and evaluation

On day 19 of incubation embryos were dissected. Deformations of body and internal organs were recorded with special focus on ovaries and testes. Gonads were photographed (Diskus, Carl H. Hilgers, Königswinter, Germany) for further analysis of the gonad surface area, in which the entire visible surface of each single gonad was determined with an image editing program (Fiji is just ImageJ, Open Source). After dissection gonads were fixed in Bouin's solution, which was removed by repeated rinsing with 80% ethanol after 24 h. Ethanol was removed by saccharose solution (10, 20 and 30% in phosphate buffered saline). Gonads were embedded in Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Netherlands) and sectioned (6 μm) by a freeze microtome (Microm HM 500 O, Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn, Germany) at -23 °C. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin.

Measurements and statistics

Histological examination was performed using a light microscope (Olympus BX50, Olympus, Tokyo, Japan) and a camera (JVC Digital Camera, KY-F75U, Yokohama, Japan). Gonadal cortex thickness of both sexes and male percentage of seminiferous tubules in left testes were measured (Fiji is just ImageJ, Open Source). Ten sections for each embryo were evaluated which were exclusively taken from the gonad's middle sectional plane as described previously (Jessl, Scheider & Oehlmann, 2018).

For the test series with the combination of tamoxifen and EE₂, the results of four test runs and for the combination of fulvestrant and EE₂, the results of a single test run were merged and analyzed. For the endpoints, gonadal cortex thickness and percentage of seminiferous tubules as well as gonad surface area data were normalized to the solvent control. Data were

analyzed using Fisher's exact test, one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test or Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Determination of sexual genotype

DNA isolation was performed using a tissue sample from the heart taken during dissection. All embryos were typed for their sexual ZZ or ZW genotype, using the PCR-based method of *Fridolfsson & Ellegren (1999)* with the primers 2550F (5'-GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA-3') and 2718R (5'-ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG-3') and a modified protocol. Both primers mark two CHD1 introns, located on the Z (CHD1Z, 600 bp) and W chromosome (CHD1W, 450 bp). Thermal cycling was composed of DNA polymerase activation at 95 °C for 15 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 40 s and a final extension step at 72 °C for 5 min followed by a melt curve (60–95 °C with a heating rate of 0.2 °C/s). Following qPCR-mediated amplification with EvaGreen[®] dye, all amplicons showed two different melting peaks based upon the different melting properties of double-stranded DNA, which resulted in characteristic bands for each sex (*Chen et al., 2012*). Both sexes had a single 600-bp CHD1-Z specific fragment with a melting temperature of ~84 °C. Females had an additional 450-bp CHD1-W female-specific fragment with a melting temperature of ~82 °C.

RESULTS

Effects of in ovo exposure to fulvestrant and EE₂

Embryonic mortality and malformations

The number of fertilized eggs, embryonic mortality and malformations per treatment-group are presented in [Table 1](#). The fertility rate of the individual groups was at least 82% with a mean total fertility rate of 92% for the whole experiment. The solvent control group showed the lowest mortality of 15%, followed by the untreated control group with 18% mortality. Sole treatment to fulvestrant as well as co-exposure to all concentrations of fulvestrant plus EE₂ showed mortality rates up to 35%. Sole treatment to EE₂ caused 46% mortality being significantly different from the control ($p < 0.05$) ([Fig. 1A](#)).

While no malformations were detected in the control groups, all substance treated groups showed one to two malformed embryos. The EE₂-treated group 1 of 22 embryos (4.55%) showed a single malformation which was found to be celosomia. Examining all groups receiving different concentrations of fulvestrant, four of 60 embryos (6.67%) showed malformations which were mainly found to be celosomia or malformations of the eyes or the beak. Examining all groups co-exposed to fulvestrant and EE₂, five of 60 embryos (8.33%) showed malformations which were mainly found to affect the beak, the eyes, the limbs, the brain or celosomia. Compared to the control, none of the tested groups showed a substance-induced increase in the rate of malformation.

Morphological observation of the gonads—gonad surface area

In females sole exposure to EE₂ or all concentrations of fulvestrant as well as co-exposure to EE₂ and lower concentrations of fulvestrant (0.1 and 1 µg/g egg) had no statistically

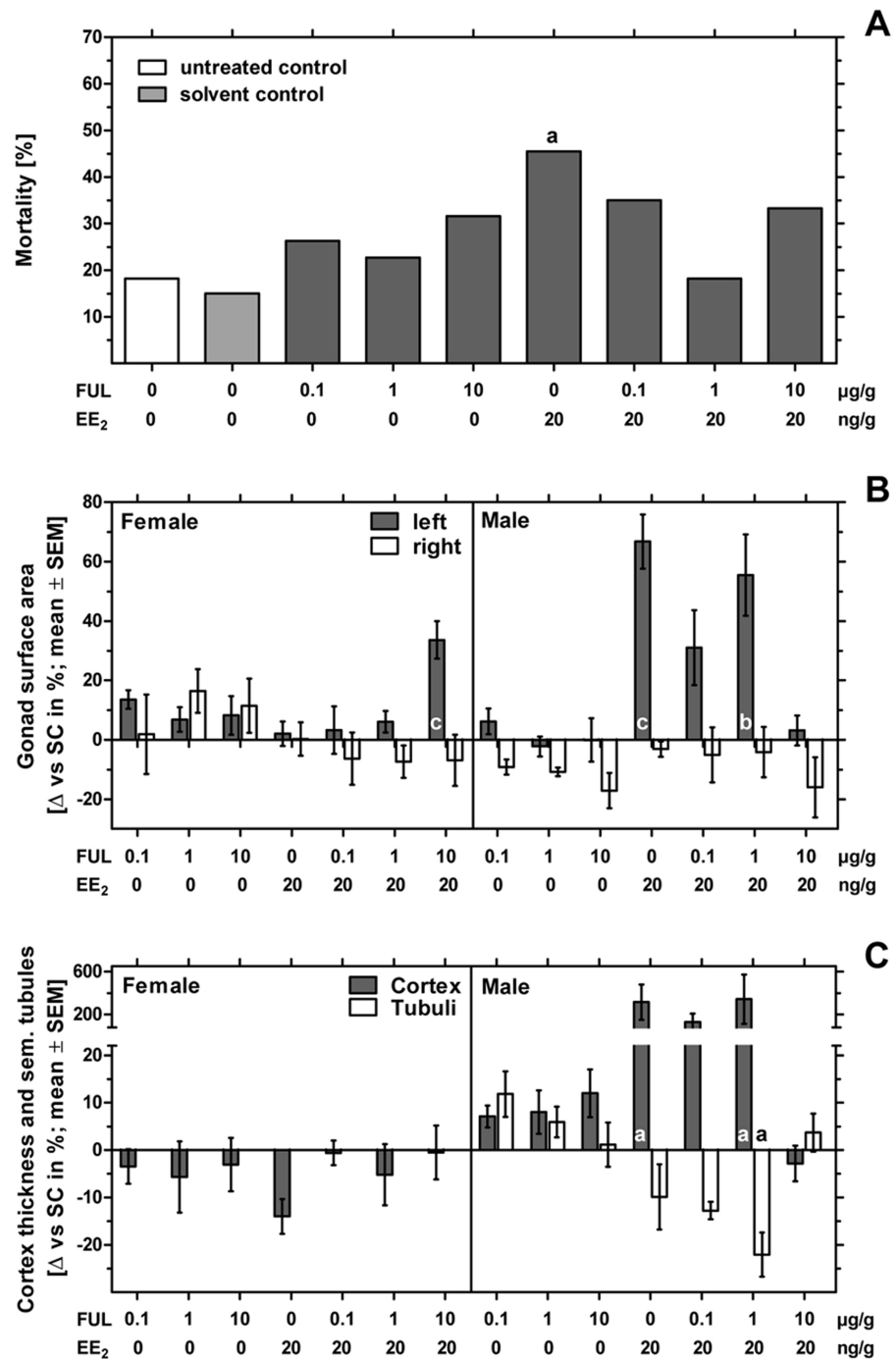


Figure 1 Effects of in ovo exposure to fulvestrant and 17 α -ethinylestradiol on mortality, left and right gonad surface area, cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of left gonad of embryos of the domestic fowl (*Gallus g. domesticus*). Effects of in ovo exposure to fulvestrant (FUL, 0.1, 1, 10 µg/g egg) and 17 α -ethinylestradiol (EE₂; 20 ng/g egg) on mortality (A), left and right gonad surface area (B) and cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of left gonad (C) of embryos of the domestic fowl (*Gallus g. domesticus*) on embryonic day 19. Statistical analysis by Fisher's exact test (A) and one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test (B, C). Grey background distinguishes the co-exposure to fulvestrant and EE₂. Lowercase indicate significant differences compared to the solvent control. Level of significance: a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$; c: $p < 0.001$.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.5094/fig-1

Table 3 Gonad surface area, gonadal cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of chicken embryos after in ovo exposure to fulvestrant (Ful, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/g}$ egg) and EE₂ (20 ng/g egg) or co-exposure to all concentrations of fulvestrant and EE₂.

Sex	Group	Gonad surface area		Cortex thickness (μm)	Seminiferous tubules (%)
		left (mm^2)	right (mm^2)		
Male	NC	4.22 \pm 0.95	3.92 \pm 0.57	10.1 \pm 0.40	28.3 \pm 4.49
	SC	3.99 \pm 0.46	3.91 \pm 0.30	10.7 \pm 0.73	30.2 \pm 1.83
	Ful 0.1	4.24 \pm 0.42	3.55 \pm 0.24	11.5 \pm 0.61	33.8 \pm 3.56
	Ful 1	3.90 \pm 0.36	3.49 \pm 0.13	11.6 \pm 1.30	32.0 \pm 2.60
	Ful 10	3.99 \pm 0.82	3.24 \pm 0.66	12.0 \pm 1.54	30.6 \pm 3.98
	EE ₂	6.66 \pm 0.82 ^c	3.79 \pm 0.23	44.6 \pm 39.3 ^a	27.3 \pm 4.65
	Ful 0.1 + EE ₂	5.23 \pm 1.23	3.71 \pm 0.89	25.0 \pm 18.3	26.4 \pm 1.23
	Ful 1 + EE ₂	6.21 \pm 1.09 ^b	3.75 \pm 0.67	47.6 \pm 49.4 ^a	23.6 \pm 2.82 ^a
	Ful 10 + EE ₂	4.12 \pm 0.53	3.29 \pm 1.05	10.4 \pm 0.91	31.4 \pm 2.70
Female	NC	10.3 \pm 0.69 ^c	2.38 \pm 0.34 ^b	143 \pm 33.9	–
	SC	8.23 \pm 0.95	1.80 \pm 0.34	154 \pm 30.0	–
	Ful 0.1	9.35 \pm 0.72	1.84 \pm 0.68	149 \pm 15.0	–
	Ful 1	8.80 \pm 1.03	2.10 \pm 0.40	145 \pm 32.7	–
	Ful 10	8.91 \pm 1.20	2.01 \pm 0.37	149 \pm 19.5	–
	EE ₂	8.40 \pm 0.91	1.81 \pm 0.27	133 \pm 15.0	–
	Ful 0.1 + EE ₂	8.50 \pm 1.98	1.69 \pm 0.45	153 \pm 8.89	–
	Ful 1 + EE ₂	8.74 \pm 1.12	1.67 \pm 0.37	146 \pm 37.2	–
	Ful 10 + EE ₂	11.0 \pm 1.37 ^c	1.68 \pm 0.41	153 \pm 21.5	–

Notes.

Statistical analysis by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. Lowercase indicate significant differences compared to the solvent control (SC). NC, untreated control. Level of significance: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$.

significant effect on left and right gonad surface area. Co-exposure to EE₂ and 10 μg fulvestrant/g egg, however, resulted in a statistically significant increase of the left gonad surface area ($p < 0.001$) (Fig. 1B and Table 3).

In males fulvestrant did not affect left and right gonad surface area at all applied sole concentrations. EE₂ administered alone or in combination with lower concentrations of fulvestrant (1 $\mu\text{g/g}$ egg) resulted in a significant increase in the left gonad surface area ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively). The affected left testes showed a female-like shape and a well visible female-typical thickened cortex region when viewed under a stereomicroscope (Fig. 2). However, a concentration of 10 μg fulvestrant/g egg completely antagonized the EE₂-induced feminization of genetic males.

Histological observation of the gonads—left testis and ovary

In females sole exposure to all concentrations of fulvestrant or co-exposure to fulvestrant and EE₂ had no statistically significant effect on ovarian cortex thickness (Fig. 1C).

Administration of EE₂ alone or in combination with 1 μg fulvestrant/g egg caused a significant increase in male gonadal cortex thickness by up to 344% ($p < 0.05$, respectively) while the percentage of seminiferous tubules decreased with increasing concentration of fulvestrant (co-exposure to EE₂ and 1 μg fulvestrant/g egg: $p < 0.05$). The affected testicular

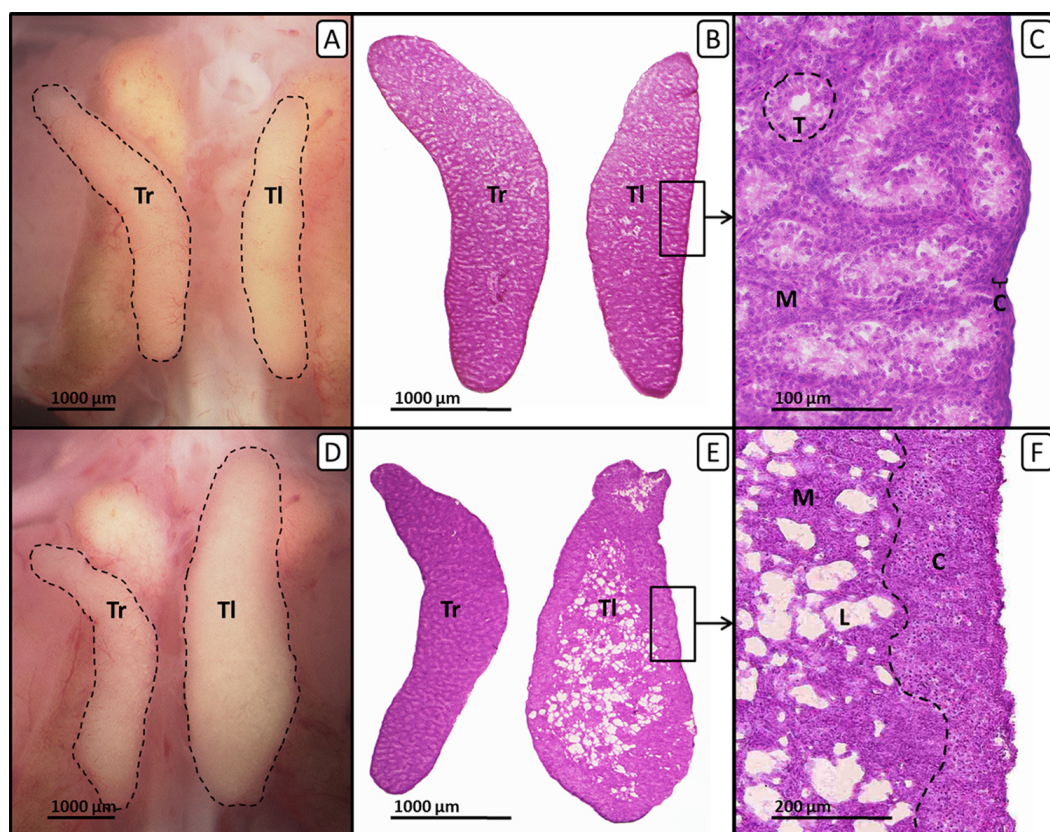


Figure 2 Right and left testis of genetic males of untreated control group and EE_2 -treated group on day 19 of embryonic development. Right and left testis of genetic males of untreated control group (A, B, C) and EE_2 -treated group (20 ng/g egg; D, E, F). (A, D) Unfixed right (“Tr”) and left (“Tl”) testis (outlined in black) on day 19 of embryonic development. Untreated control males (A) show testes of nearly identical size. EE_2 -treated males (D) show an unaffected right testis and a significantly enlarged left testis. (B, E) Histological thin sections (6 μ m) of right (“Tr”) and left (“Tl”) testis. Untreated control males (B) show testes of nearly identical size and structure. EE_2 -treated males (E) show an unaffected right testis and a significantly enlarged left testis with female-like shape and structure. (C, F) Histological thin sections (6 μ m) of left testis in close-up. Untreated control males (C) show a thin gonadal cortex layer (“C”) of three to four cells and interstitial space and seminiferous tubules (“T”) in the medulla (“M”). Left testes of EE_2 -treated males (F) show female-typical structures as a well-differentiated gonadal cortex region (“C”) with oocyte-like cells and a loosely arranged medulla (“M”) crossed by lacunar channels (“L”).

Full-size DOI: 10.7717/peerj.5094/fig-2

tissue appeared significantly changed with female-typical structures such as lacunae and a differentiated female-like gonadal cortex region with oocyte-like cells. On the contrary, the number and degree of differentiation of seminiferous tubules were visibly lower. A concentration of 10 μ g fulvestrant/g egg completely antagonized the feminization of genetic males caused by EE_2 (Table 3).

Effects of in ovo exposure to tamoxifen and EE_2 Embryonic mortality and malformations

The number of fertilized eggs, embryonic mortality and malformations per treatment-group are presented in Table 2. The fertility rate of the individual groups was at least

88% with a total fertility rate of 92% for the whole experiment. The unmanipulated negative control showed the lowest mortality of nearly 8% and differed significantly from the solvent-treated control with 28% mortality ($p < 0.001$). Sole exposure to tamoxifen showed mortality rates up to 56%. Only the group treated with 10 μg tamoxifen/g egg showed a significant difference to the solvent-treated control ($p < 0.01$). Sole exposure to 20 ng EE₂/g egg caused 24% mortality. Groups co-exposed to tamoxifen and EE₂ showed mortality rates up to 40% with a significant deviation to the solvent-treated control for the group co-exposed to EE₂ and 0.001 μg tamoxifen/g egg ($p < 0.05$) (Fig. 3A).

While no malformations were detected in the untreated negative control group, four of 75 embryos (5.33%) of the solvent-treated control showed malformations which affected the eyes, the beak, the extremities or edema or celosomia. In the EE₂-treated group three of 45 embryos (6.67%) showed malformations of the eyes, the beak or celosomia. Examining all groups receiving different concentrations of tamoxifen, five of 156 embryos (3.21%) showed malformations which were found to be celosomia, malformations of the vertebral column, the beak or the brain. There was also one egg containing two embryos conjoined at the head, showing various malformations. Examining all groups co-exposed to EE₂ and different concentrations of tamoxifen, 10 of 190 embryos (5.26%) showed malformations which were found to be celosomia, malformations of the beak or the extremities or a missing mesonephros. Compared to the untreated negative control group, the solvent-treated group and the substance-treated groups receiving EE₂ or a combination of EE₂ and 10 μg tamoxifen/g egg showed a statistically significant effect ($p < 0.05$). On the contrary, there were no significant differences between the substance-treated groups and the solvent control.

Morphological observation of the gonads—gonad surface area

In females exposure to 10 μg tamoxifen/g egg resulted in a statistically significant decrease of the left gonad surface area ($p < 0.001$) (Fig. 3B). This effect could not be antagonized by the simultaneous administration of EE₂. The combination of EE₂ and 0.1 or 1 μg tamoxifen/g egg resulted in a statistically significant increase in the left gonad surface area ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). Female right gonad surface areas were not significantly affected by sole exposure to EE₂ or tamoxifen or the co-exposure to tamoxifen and EE₂.

In comparison, male left and right gonad surface area were not significantly affected by sole exposure to all concentrations of tamoxifen. The EE₂-induced statistically significant increase of the male left gonad surface area ($p < 0.001$) could be gradually reduced through simultaneous administration of increasing tamoxifen-concentrations. From a concentration of 0.1 μg tamoxifen/g egg EE₂-related effects were largely antagonized and left gonad surface areas fluctuated around the control values (Table 4).

Cortex thickness and percentage of seminiferous tubules

In ovo exposure to all concentrations of tamoxifen as well as co-exposure to tamoxifen and EE₂ resulted in a statistically significant concentration-dependent decrease of the left ovarian cortex thickness in females (Fig. 3C). Remarkably, several females exposed to the highest concentration of tamoxifen (10 $\mu\text{g}/\text{g}$ egg) also showed an altered distribution of the

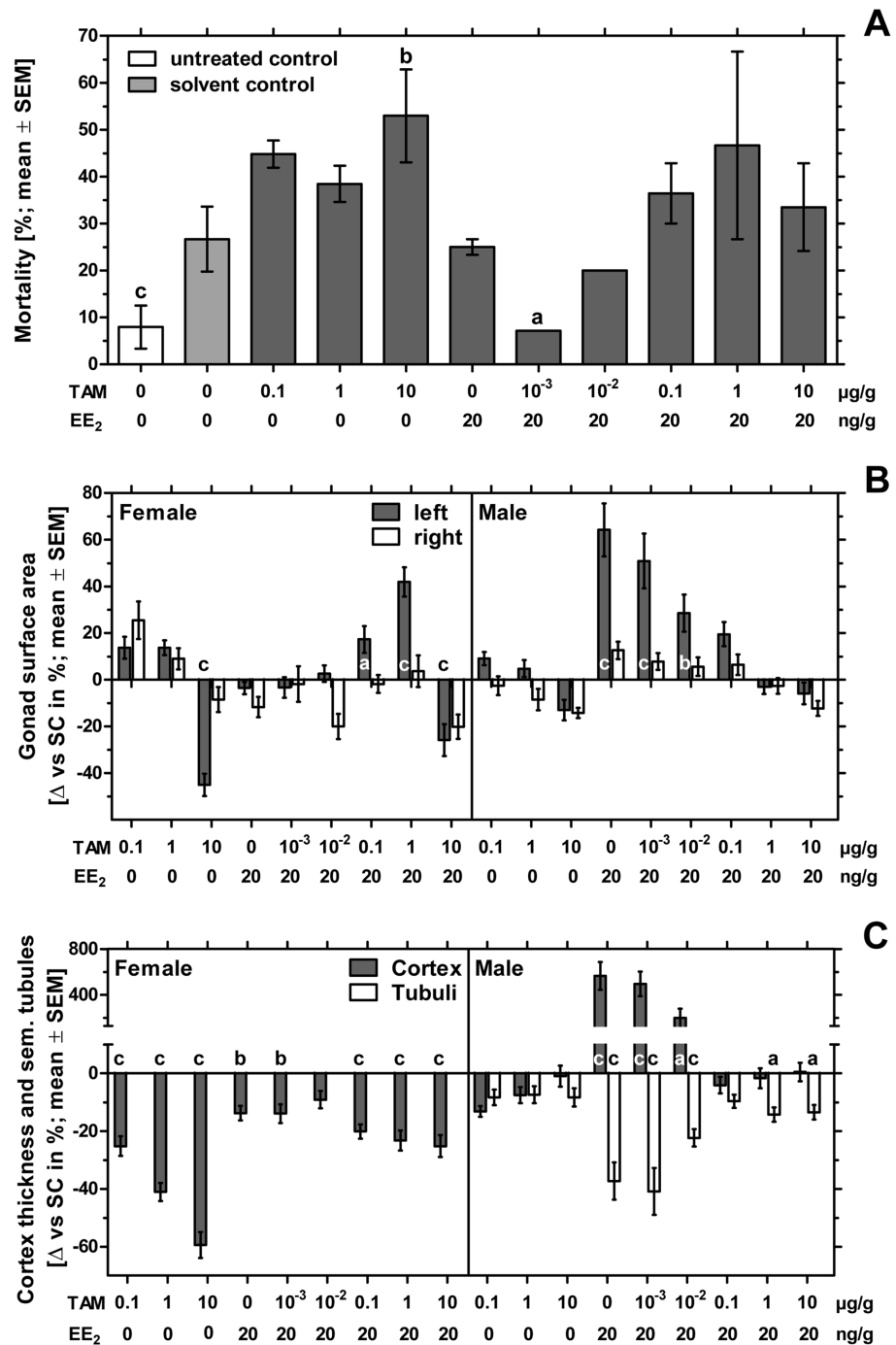


Figure 3 Effects of in ovo exposure to tamoxifen and 17 α -ethinylestradiol on mortality, left and right gonad surface area, cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of left gonad of embryos of the domestic fowl (*Gallus g. domesticus*). Effects of in ovo exposure to tamoxifen (TAM, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/g}$ egg) and 17 α -ethinylestradiol (EE₂, 20 ng/g egg) on mortality (A), left and right gonad surface area (B) and cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of left gonad (C) of embryos of the domestic fowl (*Gallus g. domesticus*) on embryonic day 19. Statistical analysis by Fisher's exact test (A), one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test or Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test (B, C). Grey background distinguishes the co-exposure to tamoxifen and EE₂. Lowercase indicates significant differences compared to the solvent control. Level of significance: a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.5094/fig-3

Table 4 Gonad surface area, gonadal cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of chicken embryos after in ovo exposure to tamoxifen (Tam, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/g}$ egg) and EE₂ (20 ng/g egg) or co-exposure to all concentrations of tamoxifen (plus 0.001, 0.01 $\mu\text{g/g}$ egg) and EE₂.

Sex	Group	Gonad surface area		Cortex thickness (μm)	Seminiferous tubules (%)
		left (mm^2)	right (mm^2)		
Male	NC	3.96 \pm 0.65	3.67 \pm 0.58 ^a	8.67 \pm 0.96 ^b	28.7 \pm 3.11
	SC	3.80 \pm 0.61	3.35 \pm 0.63	9.35 \pm 1.08	29.8 \pm 3.29
	Tam 0.1	4.15 \pm 0.41	3.26 \pm 0.53	8.12 \pm 0.61	27.3 \pm 2.90
	Tam 1	3.99 \pm 0.54	3.06 \pm 0.60	8.65 \pm 1.00	27.6 \pm 3.09
	Tam 10	3.31 \pm 0.50	2.87 \pm 0.22	9.26 \pm 0.84	27.3 \pm 2.51
	EE ₂	6.25 \pm 1.67 ^c	3.77 \pm 0.48	62.3 \pm 45.6 ^c	18.7 \pm 8.16 ^c
	Tam 0.001 + EE ₂	5.74 \pm 1.67 ^c	3.61 \pm 0.45	55.7 \pm 34.6 ^c	17.6 \pm 8.38 ^c
	Tam 0.01 + EE ₂	4.89 \pm 1.04 ^b	3.54 \pm 0.46	28.2 \pm 22.1 ^a	23.1 \pm 2.69 ^c
	Tam 0.1 + EE ₂	4.55 \pm 0.70	3.56 \pm 0.53	8.97 \pm 0.96	26.9 \pm 2.42
	Tam 1 + EE ₂	3.69 \pm 0.42	3.27 \pm 0.42	9.19 \pm 1.19	25.5 \pm 2.79 ^a
	Tam 10 + EE ₂	3.58 \pm 0.80	2.94 \pm 0.49	9.40 \pm 1.25	25.8 \pm 3.11 ^a
	Female	NC	10.2 \pm 1.48 ^b	2.20 \pm 0.41	155 \pm 11.4
SC		9.25 \pm 1.32	1.99 \pm 0.46	153 \pm 15.7	–
Tam 0.1		10.5 \pm 1.79	2.49 \pm 0.64	115 \pm 20.7 ^c	–
Tam 1		10.5 \pm 1.31	2.16 \pm 0.39	90.5 \pm 20.3 ^c	–
Tam 10		5.08 \pm 1.71 ^c	1.82 \pm 0.41	70.4 \pm 17.1 ^c	–
EE ₂		8.92 \pm 0.95	1.75 \pm 0.35	132 \pm 13.7 ^b	–
Tam 0.001 + EE ₂		8.93 \pm 1.42	1.95 \pm 0.52	132 \pm 16.4 ^b	–
Tam 0.01 + EE ₂		9.49 \pm 1.14	1.59 \pm 0.36	139 \pm 16.1	–
Tam 0.1 + EE ₂		10.8 \pm 2.13 ^a	1.95 \pm 0.30	123 \pm 14.5 ^c	–
Tam 1 + EE ₂		13.1 \pm 2.09 ^c	2.06 \pm 0.48	118 \pm 17.8 ^c	–
Tam 10 + EE ₂		6.86 \pm 2.00 ^c	1.59 \pm 0.31	115 \pm 18.3 ^c	–

Notes.

Statistical analysis by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test or Kruskal Wallis test with Dunn's post test (female right gonad surface area). Lowercase indicate significant differences compared to the solvent control (SC). NC, untreated control. Level of significance: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$.

ovarian cortex region (Fig. 4), which could not be detected at lower concentrations. The affected left ovaries were no longer covered by a continuous ovarian cortex but exhibited larger regions of uncovered medulla, partly resembling a testis. In none of any other experiments, even with different endocrine active compounds, was such a phenomenon detected (Scheider *et al.*, 2014; Scheider *et al.*, 2018; Jessl, Scheider & Oehlmann, 2018).

In males the testicular cortex thickness or the percentage of seminiferous tubules were not affected by sole tamoxifen-exposure. Administration of EE₂ alone or in combination with lower concentrations of tamoxifen (0.001 and 0.01 $\mu\text{g/g}$ egg) resulted in a statistically significant increase in testicular cortex thickness by up to 566%, which was completely suppressed at higher concentrations of tamoxifen (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/g}$ egg). By administration of EE₂ alone or in combination with lower concentrations of tamoxifen (0.001, 0.01 $\mu\text{g/g}$ egg) the percentages of seminiferous tubules were significantly decreased ($p < 0.001$). However, higher concentrations of tamoxifen (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/g}$ egg) could

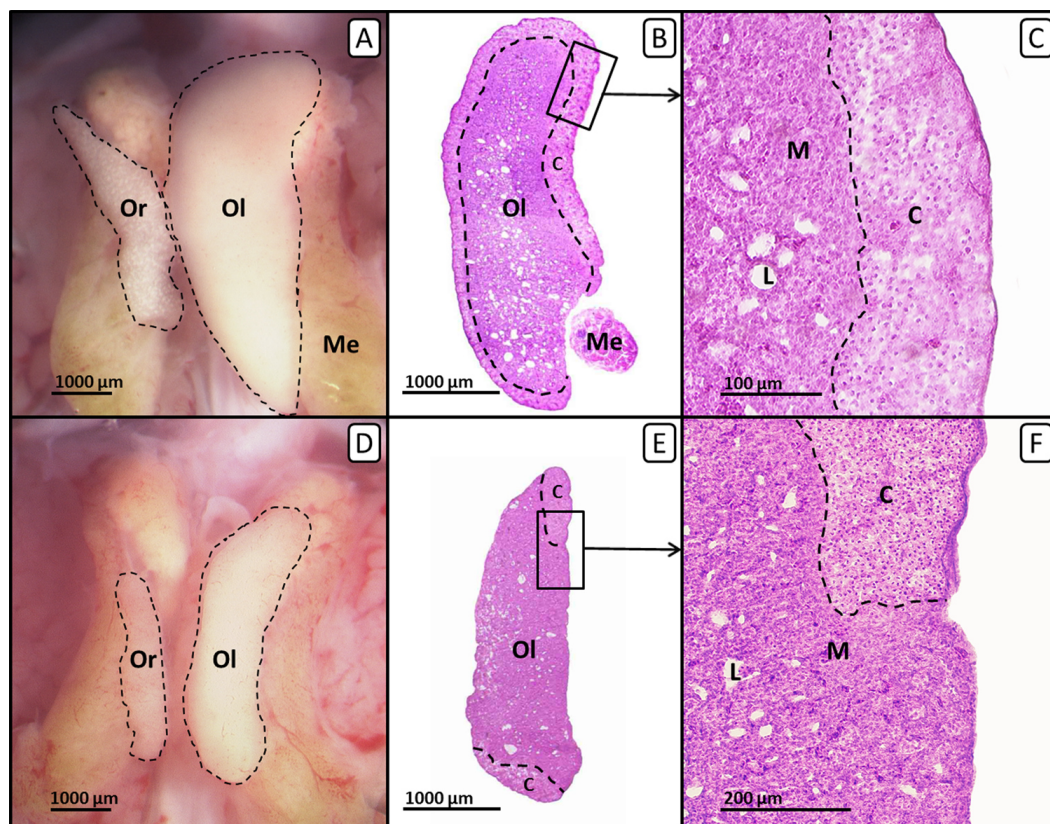


Figure 4 Right and left ovary of genetic females of untreated control group and tamoxifen-treated group on day 19 of embryonic development. Right and left ovary of genetic females of untreated control group (A, B, C) and tamoxifen-treated group (10 $\mu\text{g/g}$ egg; D, E, F). (A, D) Unfixed right (“Or”) and left (“Ol”) ovary (outlined in black) on day 19 of embryonic development. Untreated control females (A) show a regressed right ovary and a well-differentiated left ovary. Tamoxifen-treated females (D) show an unaffected right ovary and a significantly decreased left ovary. (B, E) Histological thin sections (6 μm) of right (“Or”) and left (“Ol”) ovary. Untreated control females (B) show a left ovary of female typical size and structure. The left ovarian cortex (“C”) is well-differentiated and covers almost the whole ovary (except the region close to the mesonephron (“Me”).). Tamoxifen-treated females (E) show a significantly decreased left ovary with an altered distribution of the cortex region (“C”). The left ovary is no longer covered by a continuous cortex but exposes large regions of uncovered medulla, partly resembling a male testis. (C, F) Histological thin sections (6 μm) of the left ovary in close-up. Untreated control females (C) show a well-differentiated continuous ovarian cortex region (“C”) and a loosely arranged medulla (“M”) crossed by lacunar channels (“L”). Tamoxifen-treated females (F) show a discontinuous irregular scattered ovarian cortex region (“C”) with larger regions of uncovered medulla (“M”) crossed by lacunar channels (“L”).

Full-size DOI: [10.7717/peerj.5094/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.5094/fig-4)

partly (percentage of seminiferous tubules) or completely (testicular cortex thickness) antagonize the EE_2 -induced feminization of genetic males (Table 4).

DISCUSSION

Embryonic mortality and malformations

In the present study fertilization rates were comparable for all experiments with values around 90%. These values are consistent with the results of Romanoff & Romanoff (1972),

which described a fertilization rate of almost 89% in an experiment examining 202 breeding hens. The detection of unfertilized eggs is of importance here since the calculation of mortality and the incidence of malformations is based on the number of fertile eggs. While the untreated control showed mortality rates below 20% in all experiments, in 80% (four of five) of the experiments the mortality in the solvent control was below 30%. Based on the data of various publications (*Romanoff & Romanoff, 1972; Wyatt & Howarth, 1976; DeWitt, Meyer & Henshel, 2005a; DeWitt, Meyer & Henshel, 2005b*) and our own investigations (*Jessl, Scheider & Oehlmann, 2018*), the natural mortality of unmanipulated chicken embryos is expected to be about 20%. Since it is known that carrier substances in general, or DMSO in the present case, can affect the survival of chicken embryos, for example through their intrinsic toxicity, volume, or density, an increase in mortality compared to the untreated control was expected (*Caujolle et al., 1967; Carew & Foss, 1972; Landauer & Salam, 1972; Morgan, 1974; Wyatt & Howarth, 1976*). Not only in the present study (110 untreated and 95 solvent-treated individuals in five experiments), but also in further investigations (*Jessl, Scheider & Oehlmann, 2018; 256 untreated and 258 solvent-treated individuals in 15 experiments*), all of the experiments showed mortality rates below 20% for the untreated control and a predominant proportion of the experiments (87%; 13 of 15 experiments) showed mortality rates below 30% for the solvent control. Due to the large sample size and the consistent results, we assume that the shown values can be reliably used for the comparison to substance-treated groups.

In general, the treatment of chicken embryos with any of the compounds fulvestrant or tamoxifen alone or in combination with EE₂ led to an increase in mortality as expected. However, significant deviations in mortality from the solvent control were rare and found to be concentration-independent. Groups treated with a defined concentration of fulvestrant or tamoxifen responded similarly to groups that were co-exposed to the same substance plus EE₂. The absence of a statistically significant difference between solely treated and co-exposed groups of the same substance and concentration suggests that the additional administration of EE₂ does not necessarily result in an increase in mortality, as one might have expected. Despite the increase in mortality in some groups of the experiments, a sufficient number of vital embryos remained for subsequent histological studies.

Analyzing the frequency of malformations in the five experiments, no malformations were found in the untreated control group with 110 embryos while in the solvent-treated control group four of 95 embryos (4.21%) exhibited malformations. To some extent, this statistically significant increase in the rate of malformation from untreated to solvent-treated control group reflects a weak teratogenic potential of DMSO as noted by *Wyatt & Howarth (1976)*. However, this value is still in the range of the reported spontaneous malformation rate in chicken embryos of 2–7% (*Alsop, 1919; Byerly, 1930; Caujolle et al., 1967*). In this context, the incidence of malformations in the solvent-treated control can be considered as inconspicuous.

Since there are no statistically significant differences in the frequency of malformations between the individual concentrations of the respective substances fulvestrant, tamoxifen and/or EE₂ in all experiments, they are combined in groups representing the respective substance (EE_{2total}, fulvestrant_{total}, fulvestrant + EE_{2total}, tamoxifen_{total} and tamoxifen

+ EE_{2total}). While almost all of the substance groupings show significantly higher malformation rates than the untreated control (EE_{2total}, fulvestrant_{total} and tamoxifen + EE_{2total}: $p < 0.05$; fulvestrant + EE_{2total}: $p < 0.01$), none of them are significantly different from the solvent-treated control. In addition, there are no statistically significant differences between the respective substance groupings. However, some of the substance-treated groupings show a marginally (EE_{2total}, tamoxifen + EE_{2total}; $p > 0.05$) or significantly (fulvestrant_{total}: $p < 0.05$) increased incidence of celosomia, compared to the solvent-treated control. In addition, exencephalia are exclusively found in substance-treated groups, while the formation of edema is completely absent. Various malformations have already been described, among them, for example, terata of the eyes, the beak, the brain or the formation of celosomia (Byerly, 1930; Caujolle et al., 1967). These terata largely coincide with the malformations found in the solvent- and substance-treated groups. There is no statistical evidence that treatment with fulvestrant, tamoxifen and/or EE₂ specifically favors particular terata or generally results in increased malformation rates.

Morphological observations of the gonads—gonad surface area

Since it is known that substances with endocrine potential are able to induce morphological changes in the sex organs of birds (Scheib, 1983; Berg et al., 1998; Berg et al., 1999; Berg et al., 2001; Berg, Halldin & Brunstrom, 2001; Matsushita et al., 2006; Razia et al., 2006), the chicken embryo appears as a suitable model for the study of early sexual development and the potential impact of EDCs impacting the reproductive axis. In birds, the genetic male is homozygous (ZZ), while the genetic female is heterozygous (ZW). During embryonic development the differentiation in one of the sexes depends on the level of circulating steroid hormones, mainly estrogen (Bruggeman, Van As & Decuyper, 2002). Without estrogen or external influences the undifferentiated gonads of genetic males develop into testes. In genetic females, the key enzyme P450 aromatase (P450arom) is synthesized and testosterone is metabolized to estrogen (Kagami & Hanada, 1997; Ayers, Sinclair & Smith, 2013; Scheider et al., 2014). Since P450arom is not synthesized in male gonads (Ayers, Sinclair & Smith, 2013; Scheider et al., 2014), constitutional estrogen concentration in testes is very low (Woods & Erton, 1978; Tanabe et al., 1979; Tanabe, Yano & Nakamura, 1983) and not sufficient to cause a feminization. Though, for a short time during embryonic development the estrogen receptor (ER) is detectable in male gonads, making males basically vulnerable to estrogen (Gasc, 1980; Smith, Andrews & Sinclair, 1997; Nakabayashi et al., 1998). The artificial presence of estrogen or estrogen-active EDCs at this critical time point therefore causes the differentiation of genetic males towards the phenotypically female sex as demonstrated in the present study and various other studies on domestic fowl (*Gallus g. domesticus*) and japanese quail (*Coturnix japonica*) (Sotonyi & Csaba, 1986; Etches & Kagami, 1997; Berg et al., 1998; Berg et al., 1999; Berg et al., 2001; Berg, Halldin & Brunstrom, 2001; Shibuya et al., 2004).

Furthermore, it is shown that the injection of interfering substances into fertilized eggs, such as aromatase inhibitors, can result in a stop of estrogen synthesis leading to a masculinization of ovaries (Elbrecht & Smith, 1992; Burke & Henry, 1999). Not only aromatase inhibitors, but also antiestrogens are capable of affecting female gonad

differentiation in birds. Tamoxifen, a selective ER modulator, interacts with various proteins involved in the transcription of estrogen-regulated genes (MacGregor & Jordan, 1998). In the present study sole exposure to high concentrations of tamoxifen resulted in a significant decrease of the left ovarian surface area. This data coincide with the studies of Scheib (1983) on quail embryos, which show that treatment with tamoxifen reduces the size of the left ovary and disturbs the correct formation of the left ovarian cortex. Surprisingly, sole exposure to all concentrations of fulvestrant had no such effect on female ovarian surface area. Due to its considerably higher affinity to ER compared to tamoxifen (Wakeling & Bowler, 1987; Wakeling, Dukes & Bowler, 1991) and the fact that fulvestrant-treatment results in a complete inhibition of the estrogen signaling pathway (Osborne et al., 1995; Wakeling, 1995; Wardley, 2002) we expected fulvestrant as the more potent antiestrogen. The difference between fulvestrant and tamoxifen regarding their effect on embryonic ovarian development of *Gallus domesticus* could be due to their mode of action, since tamoxifen is a partial ER antagonist, depending on the target tissue, and thus has both antiestrogenic and estrogen-like activity while fulvestrant is a pure or competitive ER antagonist without intrinsic activity (Webb et al., 1995; MacGregor & Jordan, 1998; Bentrem et al., 2001; Shou et al., 2004). However, it is unknown whether these differences can impact the activity in ovo.

The present study also demonstrates a concentration-dependent neutralization of the feminizing effect of EE₂ with increasing concentration of fulvestrant or tamoxifen. In genetic females co-exposure to EE₂ and higher concentrations of fulvestrant or tamoxifen led to a statistically significant increase in female left gonad surface area. This data coincide with the study of Scheib (1983) which shows that the feminizing effect of diethylstilbestrol on male quail embryos could be largely compensated by simultaneous tamoxifen-treatment. While in the experiments of Scheib (1983) sole treatment with the estrogenic compound diethylstilbestrol reduces the volume of the left ovary but does not affect its differentiation, co-exposure to tamoxifen and the estrogen results in a reduction of the tamoxifen-related effects in females. It can be assumed that the competition between estrogen and antiestrogen at the binding site of the ER is influenced by their differing concentrations but also by their specific binding affinity to the receptor. Blair et al. (2000) reported relative binding affinities to the ER from rat uterine cytosol preparations of 190%, 1.6% and 37.5% for EE₂, tamoxifen and fulvestrant, respectively. Because both antiestrogens were applied at doses up to factor 500 higher than the estrogen, it is likely that the estrogen is successively displaced from the ER, resulting in a neutralization of the estrogenic response.

Histological observations of the gonads—left testis and ovary

The results of the present study show that in ovo exposure to EE₂ leads to a reduction of the ovarian cortex in females. In males EE₂ causes a significantly thickened testicular cortex with oocyte-like cells and female-like structure.

Furthermore, sole treatment with fulvestrant or tamoxifen does not significantly affect differentiation of male testes, which coincides with the studies of Salzgeber, Reysbrion & Baulieu (1981) and Scheib & Baulieu (1981). Their experiments on chicken and quail show

that tamoxifen especially affects female but not male gonadogenesis. Thus, tamoxifen-treatment especially disturbed the formation of the left ovarian cortex (Scheib, 1983). In the present study, exposure to 10 µg tamoxifen/g egg results in an altered distribution of the left ovarian cortex which might be based on the specific mechanism of action of tamoxifen. Tamoxifen is a partial agonist of the ER whose effect always depends on the specific tissue along with the intrinsic activity of tamoxifen. As ER alpha is primarily expressed in the gonadal cortex (Nakabayashi et al., 1998), its blockage at high doses might have contributed to the suppression of the cortical hypertrophy in the ovarian differentiation and its unbalanced dispersal. This might lead to the speculation that in higher doses tamoxifen might improve sterility of the respecting females, as the oogonia develop in the border between cortex and medulla (Gonzalez-Moran, 2011).

Since the ER is largely irrelevant for the normal differentiation of the male sex, fulvestrant and tamoxifen remain without statistically significant effect for males. However, the feminization of genetic males of domestic fowl and quail caused by estrogenic substances can be effectively compensated by antiestrogens (Samsel, Zeis & Weniger, 1982; Scheib, 1983) which agrees with the data of the present study. It can be assumed that both estrogenic and antiestrogenic substances compete for the binding site of the ER. Accordingly, a high estrogen-concentration leads to its preferential binding to the ER and results in the feminization of male gonads. With increasing concentration of the antiestrogen the ER is successively blocked. This results in a compensation of the feminizing effects as the ER and subsequent signal cascades are not affected by the estrogen.

OVERALL CONCLUSIONS

The focus of the present work was on the study of the effects of the estrogenic compound EE₂ as well as the antiestrogenic compounds fulvestrant and tamoxifen on embryonic sex development of chicken (*Gallus g. domesticus*). In ovo exposure to EE₂ resulted in a distinct feminization of genetic males which formed female-like cortex tissue in their left gonads. In addition, EE₂-treatment resulted in a reduction of the percentage of seminiferous tubules. The antiestrogen tamoxifen influenced female sex differentiation and led to a size reduction of the left ovary and malformations of the ovarian cortex. In contrast, fulvestrant did not affect sexual differentiation in chicken in the tested concentration range. However, both antiestrogens were able to antagonize the feminizing effects of a potent estrogen in genetic males when administered simultaneously with EE₂. Since both estrogenic and antiestrogenic substances induce concentration-dependent morphological alterations of the sex organs, the chick embryo can be regarded as a promising model for the identification of chemicals with estrogenic and antiestrogenic activity. However, it should be considered that the chick embryo is not necessarily sensitive to all classes of EDCs impacting the reproductive axis. Therefore, pending studies of androgenic and antiandrogenic compounds will provide more information about the suitability of the chicken embryo test for these classes of EDCs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Andrea Misovic, Simone Ziebart, Alina Helmes and Katrin Collmar for technical assistance.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This work was carried out in the framework of the project GenOvotox II, funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF; project no 031A104B). There was no additional external funding received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:
Federal Ministry of Education and Research: 031A104B.

Competing Interests

Rebecca Lenz is an employee of Dr. Drexler and Dr. Fecher GmbH and Fabian G. Massing is an employee of ERM GmbH. Luzie Jessl is an employee of R-Biopharm AG. Jörg Oehlmann is an Academic Editor for PeerJ.

Author Contributions

- Luzie Jessl conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Rebecca Lenz and Fabian G. Massing performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Jessica Scheider and Jörg Oehlmann conceived and designed the experiments, contributed reagents/materials/analysis tools, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.

Animal Ethics

The following information was supplied relating to ethical approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

All experiments were carried out with respect for the principles of laboratory animal care, in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the German Animal Welfare Act. Fertilized eggs of white Leghorn (*G. domesticus*) were obtained from a local breeder (LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetrieb, Dieburg, Germany).

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The raw data are provided in a [Supplemental File](#).

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5094#supplemental-information>.

REFERENCES

- Ackerman JT, Eagles-Smith CA, Herzog MP, Hartman CA. 2016.** Maternal transfer of contaminants in birds: mercury and selenium concentrations in parents and their eggs. *Environmental Pollution* **210**(1):145–154 DOI [10.1016/j.envpol.2015.12.016](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.016).
- Adkins-Regan E. 1990.** *Hormonal basis of sexual differentiation in birds. Hormones, brain and behavior in vertebrates*. Vol. 8. Basel: Karger, 1–14.
- Ahn RS, Han SJ, Kim SC, Kwon HB. 2007.** Effects of butyltin compounds on follicular steroidogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **24**(2):149–154 DOI [10.1016/j.etap.2007.04.005](https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.04.005).
- Akazome Y, Mori T. 1999.** Evidence of sex reversal in the gonads of chicken embryos after oestrogen treatment as detected by expression of lutropin receptor. *Journal of Reproduction and Fertility* **115**(1):9–14 DOI [10.1530/jrf.0.1150009](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1150009).
- Alsop FM. 1919.** The effect of abnormal temperatures upon the developing nervous system in the chick embryos. *Anatomical Record* **15**(6):306–331 DOI [10.1002/ar.1090150604](https://doi.org/10.1002/ar.1090150604).
- Ayers KL, Sinclair AH, Smith CA. 2013.** The molecular genetics of ovarian differentiation in the avian model. *Sexual Development* **7**(1–3):80–94 DOI [10.1159/000342358](https://doi.org/10.1159/000342358).
- Bargar TA, Scott GI, Cobb GP. 2001.** Maternal transfer of contaminants: case study of the excretion of three polychlorinated biphenyl congeners and technical-grade endosulfan into eggs by white leghorn chickens (*Gallus domesticus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(1):61–67 DOI [10.1002/etc.5620200106](https://doi.org/10.1002/etc.5620200106).
- Bentrem DJ, Dardes RC, Liu H, Maccgregor-Schafer J, Zapf JW, Jordan VC. 2001.** Molecular mechanism of action at estrogen receptor alpha of a new clinically relevant antiestrogen (GW7604) related to tamoxifen. *Endocrinology* **142**(2):838–846 DOI [10.1210/endo.142.2.7932](https://doi.org/10.1210/endo.142.2.7932).
- Berg C, Blomqvist A, Holm L, Brandt I, Brunstrom B, Ridderstrale Y. 2004.** Embryonic exposure to oestrogen causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Reproduction* **128**(4):455–461 DOI [10.1530/rep.1.00211](https://doi.org/10.1530/rep.1.00211).
- Berg C, Halldin K, Brunstrom B. 2001.** Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(12):2836–2840 DOI [10.1002/etc.5620201224](https://doi.org/10.1002/etc.5620201224).
- Berg C, Halldin K, Brunstrom B, Brandt I. 1998.** Methods for studying xenoestrogenic effects in birds. *Toxicology Letters* **103**:671–676.

- Berg C, Halldin K, Fridolfsson AK, Brandt I, Brunstrom B. 1999.** The avian egg as a test system for endocrine disruptors: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Science of the Total Environment* **233**(1–3):57–66 DOI [10.1016/S0048-9697\(99\)00179-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00179-5).
- Berg C, Holm L, Brandt I, Brunstrom B. 2001.** Anatomical and histological changes in the oviducts of Japanese quail, *Coturnix japonica*, after embryonic exposure to ethynylestradiol. *Reproduction* **121**(1):155–165 DOI [10.1530/rep.0.1210155](https://doi.org/10.1530/rep.0.1210155).
- Berg C, Pettersson I. 2006.** Ethynyl estradiol causes female-biased sex ratio in the frog *Xenopus tropicalis*. *Marine Environmental Research* **62**:S270–S270 DOI [10.1016/j.marenvres.2006.04.041](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.041).
- Berge JA, Brevik EM, Bjorge A, Folsvik N, Gabrielsen GW, Wolkers H. 2004.** Organotins in marine mammals and seabirds from Norwegian territory. *Journal of Environmental Monitoring* **6**(2):108–112 DOI [10.1039/B311662J](https://doi.org/10.1039/B311662J).
- Biau S, Bayle S, Barbara PD, Roig B. 2007.** The chick embryo: an animal model for detection of the effects of hormonal compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**(4):1397–1403 DOI [10.1007/s00216-006-0870-y](https://doi.org/10.1007/s00216-006-0870-y).
- Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM. 2000.** The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences* **54**(1):138–153 DOI [10.1093/toxsci/54.1.138](https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.138).
- Bodiguel X, Loizeau V, Le Guellec AM, Rouspard F, Philippon X, Mellon-Duval C. 2009.** Influence of sex, maturity and reproduction on PCB and p,p'DDE concentrations and repartitions in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Science of the Total Environment* **408**(2):304–311 DOI [10.1016/j.scitotenv.2009.10.004](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.004).
- Bruggeman V, Van As P, Decuypere E. 2002.** Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* **131**(4):839–846 DOI [10.1016/S1095-6433\(02\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00022-3).
- Brunstrom B, Axelsson J, Mattsson A, Halldin K. 2009.** Effects of estrogens on sex differentiation in Japanese quail and chicken. *General and Comparative Endocrinology* **163**(1–2):97–103 DOI [10.1016/j.ygcen.2009.01.006](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.01.006).
- Burke WH, Henry MH. 1999.** Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. *Poultry Science* **78**(7):1019–1033 DOI [10.1093/ps/78.7.1019](https://doi.org/10.1093/ps/78.7.1019).
- Buzdar AU. 2001.** Endocrine therapy in the treatment of metastatic breast cancer. *Seminars in Oncology* **28**(3):291–304 DOI [10.1016/S0093-7754\(01\)90122-8](https://doi.org/10.1016/S0093-7754(01)90122-8).
- Buzdar AU, Robertson JFR. 2006.** Fulvestrant: pharmacologic profile versus existing endocrine agents for the treatment of breast cancer. *Annals of Pharmacotherapy* **40**(9):1572–1583 DOI [10.1345/aph.1G401](https://doi.org/10.1345/aph.1G401).
- Byerly TC. 1930.** The effects of breed on the growth of the chick embryo. *Journal of Morphology* **50**(2):341–359 DOI [10.1002/jmor.1050500203](https://doi.org/10.1002/jmor.1050500203).

- Carere C, Balthazart J. 2007.** Sexual versus individual differentiation: the controversial role of avian maternal hormones. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18(2):73–80 DOI 10.1016/j.tem.2007.01.003.
- Carew LB, Foss DC. 1972.** Tolerance of chicks for dimethyl sulfoxide. *Poultry Science* 51(1):206–211 DOI 10.3382/ps.0510206.
- Caujolle FM, Caujolle DH, Cros SB, Calvet MMJ. 1967.** Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 141(A1):110–126 DOI 10.1111/j.1749-6632.1967.tb34871.x.
- Cevasco A, Urbatzka R, Bottero S, Massari A, Pedemonte F, Kloas W, Mandich A. 2008.** Endocrine disrupting chemicals (EDC) with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: II. Effects on gonad histomorphology. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 147(2):241–251 DOI 10.1016/j.cbpc.2007.10.001.
- Chen C-C, Liu Y-S, Cheng C-C, Wang C-L, Liao M-H, Tseng C-N, Chang H-W. 2012.** High-throughput sex identification by melting curve analysis in blue-breasted quail and chicken. *Theriogenology* 77(9):1951–1958 DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.12.004.
- Choi MJ, Kim SC, Kim AN, Kwon HB, Ahn RS. 2007.** Effect of endocrine disruptors and ovulation in amphibians, integrative biosciences on the oocyte maturation *Rana dybowskii*. *Integrative Biosciences* 11(1):1–8 DOI 10.1080/17386357.2007.9647309.
- Davies IM, Harding MJC, Bailey SK, Shanks AM, Lange R. 1997.** Sublethal effects of tributyltin oxide on the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Marine Ecology Progress Series* 158:191–204 DOI 10.3354/meps158191.
- DeWitt JC, Meyer EB, Henshel DS. 2005a.** Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48(2):270–277 DOI 10.1007/s00244-004-2006-8.
- DeWitt JC, Meyer EB, Henshel DS. 2005b.** Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of vehicle volume. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48(2):260–269 DOI 10.1007/s00244-004-1006-2.
- Duis K, Scheider J, Warnecke D, Vander Veen A, Coors A, Knacker T, schafers C. 2014.** Substances of very high concern under REACh—an evaluation of uncertainties in the environmental risk assessment of endocrine active substances. Final report UBA-project FKZ 3710 63 416.
- Eising CM, Eikenaar C, Schwbl H, Groothuis TGG. 2001.** Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 268(1469):839–846 DOI 10.1098/rspb.2001.1594.
- Elbrecht A, Smith RG. 1992.** Aromatase enzyme-activity and sex determination in chickens. *Science* 255(5043):467–470 DOI 10.1126/science.1734525.
- Etches R, Kagami H. 1997.** Genotypic and phenotypic sex reversal. In: Harvey S, Etches RJ, eds. *Perspectives in avian endocrinology*. Bristol: Journal of Endocrinology Ltd., 57–67.

- Fridolfsson AK, Ellegren H. 1999.** A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* **30**(1):116–121 DOI [10.2307/3677252](https://doi.org/10.2307/3677252).
- Fry DM, Toone CK. 1981.** DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* **213**(4510):922–924 DOI [10.1126/science.7256288](https://doi.org/10.1126/science.7256288).
- Gasc JM. 1980.** Estrogen target-cells in gonads of the chicken-embryo during sexual-differentiation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **55**(FEB):331–342.
- Gonzalez-Moran MG. 2011.** Histological and stereological changes in growing and regressing chicken ovaries during development. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* **294**(5):893–904 DOI [10.1002/ar.21364](https://doi.org/10.1002/ar.21364).
- Gooding MP, Wilson VS, Folmar LC, Marcovich DT, LeBlanc GA. 2003.** The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environmental Health Perspectives* **111**(4):426–430.
- Grote K, Stahlschmidt B, Talsness CE, Gericke C, Appel KE, Chahoud I. 2004.** Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology* **202**(3):145–158 DOI [10.1016/j.tox.2004.05.003](https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.05.003).
- Hamburger V, Hamilton HL. 1992.** A series of normal stages in the development of the chick-embryo (reprinted from *Journal of Morphology*, Vol. 88, 1951). *Developmental Dynamics* **195**(4):231–272 DOI [10.1002/aja.1001950404](https://doi.org/10.1002/aja.1001950404).
- Henderson IC (ed.) 1991.** *Endocrine therapy of metastatic breast cancer*. Philadelphia: Harris, JR; Hellman, S; Henderson, IC.
- Hoffmann F, Kloas W. 2012.** The antiestrogens tamoxifen and fulvestrant abolish estrogenic impacts of 17 alpha-ethinylestradiol on male calling behavior of *Xenopus laevis*. *PLOS ONE* **7**(9):8 DOI [10.1371/journal.pone.0044715](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044715).
- Jessl L, Scheider J, Oehlmann J. 2018.** The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for mammalian experiments—validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals. *Chemosphere* **196**:502–513 DOI [10.1016/j.chemosphere.2017.12.131](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.131).
- Kagami H, Hanada H. 1997.** Current knowledge of sexual differentiation in domestic fowl. *Worlds Poultry Science Journal* **53**(2):111–123 DOI [10.1079/WPS19970012](https://doi.org/10.1079/WPS19970012).
- Kamata R, Takahashi S, Shimizu A, Shiraishi F. 2006.** Avian transgenerational reproductive toxicity test with in ovo exposure. *Archives of Toxicology* **80**(12):846–856 DOI [10.1007/s00204-006-0118-9](https://doi.org/10.1007/s00204-006-0118-9).
- Keibel F, Abraham K. 1900.** *Normentafel zur Entwicklungsgeschichte des Huhnes, Gallus domesticus*. Jena: Fischer.
- Landauer W, Salam N. 1972.** Aspects of dimethyl sulfoxide as solvent for teratogens. *Developmental Biology* **28**(1):35–46 DOI [10.1016/0012-1606\(72\)90124-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(72)90124-8).
- MacGregor JI, Jordan VC. 1998.** Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological Reviews* **50**(2):151–196.
- Matsushita S, Yamashita J, Iwasawa T, Tomita T, Ikeda M. 2006.** Effects of in ovo exposure to imazalil and atrazine on sexual differentiation in chick gonads. *Poultry Science* **85**(9):1641–1647 DOI [10.1093/ps/85.9.1641](https://doi.org/10.1093/ps/85.9.1641).

- McAllister BG, Kime DE. 2003.** Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **65**(3):309–316 DOI [10.1016/S0166-445X\(03\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00154-1).
- Morgan W. 1974.** Toxic effect of a radioprotectant (DMSO) on young chicken embryos. *Poultry Science* **53**(5):1958–1958.
- Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T, Mizuno S. 1998.** Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *Journal of Molecular Endocrinology* **20**(2):193–202 DOI [10.1677/jme.0.0200193](https://doi.org/10.1677/jme.0.0200193).
- OECD. 2007.** Test No. 440: uterotrophic bioassay in rodents: a short-term screening test for oestrogenic properties, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Paris: OECD Publishing DOI [10.1787/9789264067417-en](https://doi.org/10.1787/9789264067417-en).
- OECD. 2009.** Test No. 441: hershberger bioassay in rats: a short-term screening assay for (Anti)Androgenic properties, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Paris: OECD Publishing DOI [10.1787/9789264076334-en](https://doi.org/10.1787/9789264076334-en).
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Ternes TA. 2006.** Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda : Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives* **114**:127–133.
- Osborne CK, Coronadoheinsohn EB, Hilsenbeck SG, McCue BL, Wakeling AE, McClelland RA, Manning DL, Nicholson RI. 1995.** Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast-cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **87**(10):746–750 DOI [10.1093/jnci/87.10.746](https://doi.org/10.1093/jnci/87.10.746).
- Ottinger MA, Abdelnabi MA. 1997.** Neuroendocrine systems and avian sexual differentiation. *American Zoologist* **37**(6):514–523 DOI [10.1093/icb/37.6.514](https://doi.org/10.1093/icb/37.6.514).
- Peakall DB, Lincer JL. 1996.** Do PCBs cause eggshell thinning? *Environmental Pollution* **91**(1):127–129 DOI [10.1016/0269-7491\(95\)00012-G](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00012-G).
- Pettersson I, Arukwe A, Lundstedt-Enkel K, Mortensen AS, Berg C. 2006.** Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology* **79**(4):356–365 DOI [10.1016/j.aquatox.2006.07.004](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.004).
- Razia S, Maegawa Y, Tamotsu S, Oishi T. 2006.** Histological changes in immune and endocrine organs of quail embryos: exposure to estrogen and nonylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**(3):364–371 DOI [10.1016/j.ecoenv.2005.07.026](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.026).
- Romanoff AL, Romanoff AJ. 1972.** *Pathogenesis of the avian embryo—an analysis of causes of malformations and prenatal death*. New York: Wiley.
- Salzgeber B, Reysbrion M, Baulieu EE. 1981.** Modification of the female gonads in the chick-embryo induced by tamoxifen. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences* **293**(2):133–138.
- Samsel J, Zeis A, Weniger JP. 1982.** Feminization in the chick-embryo testis by diethylstilbestrol and antagonizing action of tamoxifen. *Biochimie* **64**(5):369–376 DOI [10.1016/S0300-9084\(82\)80442-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(82)80442-2).

- Scheib D. 1983.** Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* 23:87–92.
- Scheib D, Baulieu EE. 1981.** Inhibiting effects of tamoxifen on the female differentiation of the gonads of quail embryos. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie* 294(7):513–518.
- Scheider J, Afonso-Grunz F, Hoffmeier K, Horres R, Groher F, Rycak L, Oehlmann J, Winter P. 2014.** Gene expression of chicken gonads is sex- and side-specific. *Sexual Development* 8(4):178–191 DOI 10.1159/000362259.
- Scheider J, Afonso-Grunz F, Jessl L, Hoffmeier K, Winter P, Oehlmann J. 2018.** Morphological and transcriptomic effects of endocrine modulators on the gonadal differentiation of chicken embryos: the case of tributyltin (TBT). *Toxicology Letters* 284:143–151 DOI 10.1016/j.toxlet.2017.11.019.
- Shibuya K, Mizutani M, Wada M, Sato K, Nunoya T. 2004.** A new screening model using F1 (AWE × WE) japanese quail embryo for evaluating sex reversal effects. *Journal of Toxicologic Pathology* 17(4):245–252 DOI 10.1293/tox.17.245.
- Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R. 2004.** Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 96(12):926–935 DOI 10.1093/jnci/djh166.
- Smith CA, Andrews JE, Sinclair AH. 1997.** Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. (vol 60, pg 295, 1997). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 62(4):361–361 DOI 10.1016/S0960-0760(97)80910-7.
- Sotonyi PT, Csaba G. 1986.** Effect of prenatal and or neonatal diethylstilbestrol (DES) or allylestrenol (AE) treatment on the postnatal-development of the chicken ovary. *Acta Biologica Hungarica* 37(3–4):189–196.
- Starck M, Ricklefs R. 1997.** *Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum*. Vol. 1. Oxford: Oxford University Press.
- Sun LW, Zha JM, Wang ZJ. 2009.** Effects of binary mixtures of estrogen and antiestrogens on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 93(1):83–89 DOI 10.1016/j.aquatox.2009.03.010.
- Tanabe Y, Nakamura T, Fujioka K, Doi O. 1979.** Production and secretion of sex steroid-hormones by the testes, the ovary, and the adrenal-glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* 39(1):26–33 DOI 10.1016/0016-6480(79)90189-8.
- Tanabe Y, Yano T, Nakamura T. 1983.** Steroid-hormone synthesis and secretion by testes, ovary, and adrenals of embryonic and post-embryonic ducks. *General and Comparative Endocrinology* 49(1):144–153 DOI 10.1016/0016-6480(83)90018-7.
- Wakeling AE. 1995.** Use of pure antiestrogens to elucidate the mode of action of estrogens. *Biochemical Pharmacology* 49(11):1545–1549 DOI 10.1016/0006-2952(94)00528-T.
- Wakeling AE, Bowler J. 1987.** Steroidal pure antiestrogens. *Journal of Endocrinology* 112(3):R7–R10 DOI 10.1677/joe.0.112R007.

- Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. 1991.** A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Research* **51(15)**:3867–3873.
- Wardley AM. 2002.** Fulvestrant: a review of its development, pre-clinical and clinical data. *International Journal of Clinical Practice* **56(4)**:305–309.
- Watts MM, Pascoe D, Carroll K. 2001.** Chronic exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera : Chironomidae). *Aquatic Toxicology* **55(1-2)**:113–124 DOI [10.1016/S0166-445X\(01\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00148-5).
- Watts MM, Pascoe D, Carroll K. 2003.** Exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **54(2)**:207–215 DOI [10.1016/S0147-6513\(02\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00029-5).
- Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ. 1995.** Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway—potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Molecular Endocrinology* **9(4)**:443–456.
- Woods JE, Erton LH. 1978.** Synthesis of estrogens in the gonads of the chick-embryo. *General and Comparative Endocrinology* **36(3)**:360–370 DOI [10.1016/0016-6480\(78\)90117-X](https://doi.org/10.1016/0016-6480(78)90117-X).
- Wyatt RD, Howarth B. 1976.** Effect of dimethyl-sulfoxide on embryonic survival and subsequent chick performance. *Poultry Science* **55(2)**:579–582 DOI [10.3382/ps.0550579](https://doi.org/10.3382/ps.0550579).
- Yu MX, Wang JY, Liu W, Qin JW, Zhou Q, Wang YA, Huang HH, Chen WL, Ma C. 2014.** Effects of tamoxifen on the sex determination gene and the activation of sex reversal in the developing gonad of mice. *Toxicology* **321**:89–95 DOI [10.1016/j.tox.2014.04.006](https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.04.006).
- Zhang JL, Zuo ZH, Chen YX, Zhao Y, Hu S, Wang CG. 2007.** Effect of tributyltin on the development of ovary in female cuvier (*Sebastes marmoratus*). *Aquatic Toxicology* **83(3)**:174–179 DOI [10.1016/j.aquatox.2007.03.018](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.018).
- Zheng XB, Luo XJ, Zeng YH, Wu JP, Chen SJ, Mai BX. 2014.** Halogenated flame retardants during egg formation and chicken embryo development: maternal transfer, possible biotransformation, and tissue distribution. *Environmental Toxicology and Chemistry* **33(8)**:1712–1719 DOI [10.1002/etc.2588](https://doi.org/10.1002/etc.2588).

A.3 Morphological and transcriptomic effects of endocrine modulators on the gonadal differentiation of chicken embryos: The case of tributyltin (TBT)

Jessica Scheider, Fabian Afonso-Grunz, Luzie Jessl, Klaus Hoffmeier, Peter Winter, Jörg Oehlmann

Erschienen in:

Toxicology Letters

Volume: 284 (2018)

Seiten: 143-151

Erklärung zu den Autorenteilen an der Publikation: Morphological and transcriptomic effects of endocrine modulators on the gonadal differentiation of chicken embryos: The case of tributyltin (TBT)

Status: publiziert

Name der Zeitschrift: Toxicology Letters (Volume 284 (2018), Seiten 143-151)

Beteiligte Autoren: Jessica Scheider (JS), Fabian Afonso-Grunz (FA), Luzie Jessl (LJ), Klaus Hoffmeier (KH), Peter Winter (PW), Jörg Oehlmann (JO)

Was hat die Promovierende bzw. was haben die Co-Autoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierende LJ:	0%
Co-Autor JS:	40%
Co-Autor JO:	25%
Co-Autor FA:	10%
Co-Autor PW:	25%

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierende LJ:	0%
Co-Autor JS:	60% (Injektion, Bebrütung, Gonadenisolation, Histologie)
Co-Autor FA:	30% (Präparation für SuperSAGE)
Co-Autor KH:	10% (Präparation für SuperSAGE)

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

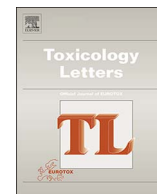
Promovierende LJ:	10% (Aufarbeitung der Histologie-Rohdaten)
Co-Autor JS:	60% (Aufarbeitung aller Rohdaten, Erstellung von Abbildungen)
Co-Autor FA:	30% (Aufarbeitung der SuperSAGE-Rohdaten)

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierende LJ:	10% (Interpretation und Analyse)
Co-Autor JS:	50% (Interpretation und Analyse, Publikationsrecherche)
Co-Autor FA:	40% (Interpretation und Analyse)

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierende LJ:	5%
Co-Autor JS:	50%
Co-Autor FA:	30%
Co-Autor JO:	5%
Co-Autor KH:	5%
Co-Autor PW:	5%



Morphological and transcriptomic effects of endocrine modulators on the gonadal differentiation of chicken embryos: The case of tributyltin (TBT)

Jessica Scheider^{a,*}, Fabian Afonso-Grunz^{b,c}, Luzie Jessl^{a,b}, Klaus Hoffmeier^b, Peter Winter^b, Jörg Oehlmann^a

^a Goethe University Frankfurt am Main, Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Department Aquatic Ecotoxicology, Max-von-Laue-Str. 13, 60438, Frankfurt/M., Germany

^b GenXPro GmbH, Altenhöferallee 3, 60438, Frankfurt/M., Germany

^c Goethe University Frankfurt am Main, Institute for Molecular BioSciences, Max-von-Laue-Str. 9, 60438, Frankfurt/M., Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

Endocrine disruption
Gonads
Development
Testosterone
Androgen
Sex reversal
Masculinization
Ovary
Testis
Chicken

ABSTRACT

Morphological malformations induced by tributyltin (TBT) exposure during embryonic development have already been characterized in various taxonomic groups, but, nonetheless, the molecular processes underlying these changes remain obscure. The present study provides the first genome-wide screening for differentially expressed genes that are linked to morphological alterations of gonadal tissue from chicken embryos after exposure to TBT. We applied a single injection of TBT (between 0.5 and 30 pg as Sn/g egg) into incubated fertile eggs to simulate maternal transfer of the endocrine disruptive compound. Methyltestosterone (MT) served as a positive control (30 pg/g egg). After 19 days of incubation, structural features of the gonads as well as genome-wide gene expression profiles were assessed simultaneously. TBT induced significant morphological and histological malformations of gonadal tissue from female embryos that show a virilization of the ovaries. This phenotypical virilization was mirrored by altered expression profiles of sex-dependent genes. Among these are several transcription and growth factors (e.g. FGF12, CTCF, NFIB), whose altered expression might serve as a set of markers for early identification of endocrine active chemicals that affect embryonic development by transcriptome profiling without the need of elaborate histological analyses.

1. Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) represent a potential risk for animals because of their ability to interfere with endogenous endocrine pathways through various molecular processes. Tributyltin (TBT) is a known endocrine disrupter and a highly toxic compound with a complex toxicity profile. This organotin compound affects *inter alia* calcium homeostasis, inhibits oxidative phosphorylation as well as ion transport processes, interferes with the cytochrome P450 dependent monooxygenase system by inhibition of aromatase as the key enzyme for the conversion of androgens to estrogens and is a potent agonist of the retinoid X receptor (RXR) (Alzieu, 2000; Dmetrichuk et al., 2008; Gooding and LeBlanc, 2001; Nishikawa et al., 2004; OECD, 2010; Oberdörster and McClellan-Green, 2000; Sekizawa et al., 2017). TBT has widely been used as an antifouling. Environmental levels of TBT have been found up to 197 ng TBT-Sn/L in sea water and up to 1,198 ng TBT-Sn/g dry weight in blue mussels (*Mytilus edulis*) (Chau et al., 1997;

Rodríguez-González et al., 2006). Accelerated by UV radiation, increasing temperature, and biological activity by microorganisms, TBT may degrade through sequential dealkylation to dibutyltin (DBT), monobutyltin (MBT), and inorganic tin, becoming progressively less toxic in the process (Antizar-Ladislao, 2008; Gadd, 2000). Indeed, information on the mechanisms of TBT detoxification is still limited (Dubey and Roy, 2003). Since 2008, the use of TBT in antifouling paints is banned internationally (Antizar-Ladislao, 2008).

TBT affects a wide range of non-target organisms from various invertebrate phyla to different classes of vertebrates. It causes adverse effects by disruption of their endocrine system such as abnormal shell growth, imposex and intersex development (Alzieu, 2000; Oehlmann et al., 1998; Stroben et al., 1992). TBT may bioaccumulate in higher trophic levels (EFSA, 2004), and thus may pose a threat for predators, although data on TBT tissue concentration in birds is scarce and information on TBT concentration in bird eggs is not available. Mollusk and fish-eating coastal seabirds seem to be particularly concerned by

* Corresponding author.

E-mail address: J.Scheider@bio.uni-frankfurt.de (J. Scheider).

accumulating TBT from their prey from a theoretical standpoint (Kannan and Falandysz, 1997; Kannan et al., 1998). In livers of the Japanese common cormorant (*Phalacrocorax carbo*) up to 9 ng Sn/g wet weight were found (Guruge et al., 1997) and in birds (grebes, tufted ducks, cormorants) in the Netherlands measured TBT concentrations ranged from 9 to 28 ng Sn/g dry weight (Ståb et al., 1996). Measured levels were considerably lower than TBT levels in fish and invertebrates from the same area serving as food for the birds. These results indicate a lower biomagnification potential for TBT in birds than expected which reflects their good capability to metabolize TBT via phase I pathways (cytochrome P450-dependent debutylation) (Veltman et al., 2006) and the seasonal moulting as an efficient elimination route of organotins. Feathers of cormorants have shown to contain up to 30% of the total body burden of butyltins probably due to feather proteins that have a high affinity for organotins (Guruge et al., 1997).

The adverse effects of TBT on the gonads have already been shown for both, sexually mature animals and developing embryos in a broad range of species. Virilization and even sex-reversal of female gastropods, as well as effects on sex differentiation in other invertebrate and vertebrate groups are clear examples of endocrine disruption by TBT in early and later life stages starting at 1–20 ng TBT-Sn/L in gastropods (Davies et al., 1997; Gooding et al., 2003; His and Robert, 1985; Matthiessen and Gibbs, 1998; OECD, 2010; Wang et al., 2010). At similar exposure levels, effects on sex ratio were also observed in a sexual development test with the zebrafish *Danio rerio* (McAllister and Kime, 2003). In mice, prenatal TBT-exposure resulted in lower body weight, prolonged diestrus or extended periods of estrus during adulthood (Si et al., 2012). In human placenta, Heidrich and co-workers (Heidrich et al., 2001) demonstrated an inhibition of aromatase activity in response to TBT with an IC_{50} of 0.7 μ gTBT-Sn/L.

In general, ovarian follicles from lower vertebrates such as fish and amphibians exhibited a comparable sensitivity to butyltins like mammalian ovary tissue cultured *in vitro* (Ahn et al., 2007; Yamazaki et al., 2005). For many of the observed TBT effects on sexual differentiation in the various wildlife groups aromatase seems to be the most prominent target. The modulation of aromatase activity is likely to result in a hormonal imbalance with an altered estrogen/androgen level and finally in the formation of ovotestes during development (Ahn et al., 2007; Heidrich et al., 2001; Nakanishi et al., 2006). However, sensitivity of steroidogenic enzymes to exogenous chemicals differs between ovaries and testes. In mammals, male sexual differentiation is dependent on testosterone (Cunha et al., 2004; Marker et al., 2003; Ricke et al., 2004). In contrast, differentiation of reproduction organs and sexual behaviour in birds is regulated by estrogens. If estrogen synthesis is inhibited, genetically female birds may develop into phenotypic males (Bannister et al., 2011). Higher levels of estrogen, on the other hand, feminise male embryos: In Japanese quails (*Coturnix japonica*), Berg and colleagues showed that administration of synthetic estrogens results in development of an ovary-like tissue in the left testis, while malformations occur in the Müllerian duct of female quails (Berg et al., 1999). In line with this, the treatment of genetic females with male hormones like e.g. 17 α -methyltestosterone (MT) results in a characteristic virilization that affects the gonads, accessory sex organs as well as behaviour in a wide range of organisms, such as molluscs, fish, turkeys, and rats (Alzieu, 2000; Feist et al., 1995; Memon et al., 2008; Singh, 2013; Yamasaki et al., 2003).

Like in mammals, the avian mother affects the development of its offspring not only by transferred genetic material, but also by transferring hormones (Carere and Balthazart, 2007). Substances incorporated by the mother may consequently also influence offspring development even originally or as metabolites in the allantoic fluid (Kamata et al., 2006). Contrasting to other test systems that employ mammals or aquatic species, however, the chicken egg represents a closed system that lacks any exchange with its environment except for the interchange of gases. A unique injection of a testing compound results in chronic chemical exposure, because no exchange or loss of the

test compound is possible. A single test compound injection at a very early developmental phase may therefore be sufficient to significantly influence the developing embryo. Consequently, chicken eggs provide a different system for assessment of the effects of chronic chemical exposure compared to aquatic systems, where the test compound is introduced into the environment (Ahn et al., 2007; Bannister et al., 2011; Berg et al., 1999; Carere and Balthazart, 2007; Cunha et al., 2004; Davies et al., 1997; Feist et al., 1995; Gooding et al., 2003; Heidrich et al., 2001; His and Robert, 1985; Kamata et al., 2006; Marker et al., 2003; McAllister and Kime, 2003; Memon et al., 2008; Nakanishi et al., 2006; Ricke et al., 2004; Si et al., 2012; Singh, 2013; Yamasaki et al., 2003; Yamazaki et al., 2005; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2013).

Here we present a comprehensive morphological and histological study of chicken embryonic gonads after exposure to the endocrine modulator TBT along with a genome-wide transcriptome analysis of sex-specific gene expression. We investigated whether effects of TBT on embryonic survival and development before hatching, with special emphasis on the structure of the gonads in the common domestic hen (*Gallus gallus domesticus*), are accompanied by characteristic shifts in gene expression of the gonads.

2. Materials and Methods

2.1. Substances

The tested substances comprised tributyltin chloride (TBT-Cl, CAS-no. 1461-22-9, 96% p.a., Sigma-Aldrich, Munich) and 17 α -methyltestosterone (MT, CAS-no. 58-18-4, \geq 97% HPLC, Sigma-Aldrich, Munich), which served as positive control. For histological analysis chicken embryos were exposed to four doses of TBT (0.5, 3, 10 and 30 pg TBT-Sn/g egg), while gene expression profiling was performed after exposure to 10 pg TBT-Sn/g egg. All TBT doses are provided as tributyltin as tin (TBT-Sn). These doses can be converted to tributyltin chloride (TBT-Cl) by multiplying with factor 2.44 (1 pg TBT-Sn/g = 2.44 pg TBT-Cl/g). MT was injected at a dose of 30 pg MT/g egg. For both test substances sesame oil (Oleum Sesame Raffinatum, CAS-no. 8008-47-0, Sigma-Aldrich, Munich) was used as solvent with an injected volume of 8 μ L per egg, irrespective of the dose. To simulate the maternal transfer, the solvent and tested substances were injected directly into the yolk, right under the embryonic tissue, with a Hamilton syringe. Injection holes were subsequently sealed with 3% agarose to allow the passage of air and humidity.

2.2. Ethics statement

All experiments were carried out with respect for the principles of laboratory animal care, in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the German Animal Welfare Act. All guidelines have been followed, complying with the ARRIVE guidelines. These experiments are pre-tests for the development of a test system using younger chicken embryos within the scope of a new animal replacement (3R) system (Jessel et al., 2017; Russel and Burch, 1959; Scholz et al., 2013).

2.3. Exposure of embryos

Six exposure experiments were performed with a total of 301 newly laid fertile chicken eggs (*Gallus gallus domesticus*, White Leghorn), which were obtained from a commercial local supplier (LSL Rhein-Main, Schaaheim). The eggs were incubated in batches of up to 20 eggs per day, while remaining eggs were stored up to 5 days at 16 \pm 1 $^{\circ}$ C to prevent the start of development. Eggs were bred in a ThermoStar 100 egg incubator (J. Hemel Brutgeräte, Verl, Germany) and spaced so that they were not in contact with one another. Incubation was performed at 37.6 \pm 0.1 $^{\circ}$ C and 60 \pm 5% humidity, and eggs were turned once

every 2 hours. After 24 hours of incubation (embryonic day (ED) 1), the eggs were candeled and randomized into 7 treatment groups: control (untreated/not injected), solvent control (only sesame oil injected), positive control (MT), and four TBT exposure groups (doses: 0.5, 3, 10 and 30 pg TBT-Sn/g egg), not fertilized eggs were excluded. Eggs were candled on ED 7, 14, and 17 and dead embryos observed during candling were removed from egg shells and examined for possible causes of death. Embryos were decapitated 2 days before anticipated hatching on embryonic day 19 (ED19), and dissected under a microscope. Phenotypical sexing and morphologic judgment was blindly performed according to the respective gonad morphology before further processing for histological and genetic analyses. If a female showed a smaller left and/or a bigger right gonad than normal, it was used as a first marker for virilization.

2.4. Gonad tissue isolation and processing for histological analysis

Gonads were isolated together with the underlying mesonephros to provide a landmark for stereoscopic adjustment after histological processing. Tissues were fixed using Bouin's solution (15 mL saturated aquatic solution of picric acid with 5 mL formalin 40% and 1 mL glacial acetic acid) followed by repeated EtOH 70% rinsing until picric acid was removed (picric acid colors EtOH yellowish, thus, all picric acid was removed if EtOH stayed colorless). 6 µm cryo-slices from the middle of the gonads were stained by Hematoxylin-Eosin followed by measuring of cortex thickness and counting of *Tubuli seminiferi* in female gonads under a microscope (Olympus BX 50) using image processing (Diskus 4.5, Hilgers, Königswinter, Germany). 10 slices per individual were used for analysis. If a female gonad showed a noticeable thinner cortex and/or more than 10 seminiferous cords (cut off ration to exclude false positives), it was considered as virilized in a blind treatment examination.

2.5. Genetic sexing

For genetic sex determination, blood samples from each embryo were collected in absolute EtOH. and stored at –20 °C until isolation of the DNA with the DNEasy isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genetic sexing was carried out by a PCR using the primers 2550F (5'-GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA-3') and 2718R (5'-ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG-3') (Fridolfsson and Ellegren, 1999). These primers target at CHD1 introns, located on the Z (CHD1Z, 600 bp) and W chromosome (CHD1W, 450 bp). Thermal cycling comprised DNA polymerase activation at 95 °C for 1 min followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 1 min and a final extension step at 72 °C for 3 min. All amplifications were performed on an advanced primus 96 thermocycler (Peqlab). Amplicons derived from this modified protocol were separated on a 1.4% agarose gel, where they resolved into one band (Z) in the case of male or two bands (Z + W) in the case of female embryos.

2.6. Gonad tissue isolation for transcriptome analysis

As gonads could be used either for histology or genetic analyzing, 2-3 individuals per test series, sex and group were taken for genetic analysis. Because of the six test series, we used ten individuals altogether for transcriptome analysis. Their individual right and left gonads were excised, cleaned from adhesive tissue and immediately frozen in 200 µl RNA lysis buffer (Promega) for later RNA isolation. Total RNA of whole right and left gonads (ten individuals of each group: control, solvent control, TBT 10 pg TBT-Sn/g egg and MT 30 pg/g egg) was extracted using the SV Total RNA Isolation System Kit according to manual 048 (Promega). Deviating from the protocol, on-column DNaseI digestion of genomic DNA was elongated from original 15 min to 30 min. A second DNaseI digestion was carried out with Baseline-Zero™ DNase (Epicentre; provided by Biozym Scientific GmbH, Hessisch

Oldendorf, Germany) in solution to ensure that the samples were completely free of DNA. Total RNA concentration was estimated in a dilution series with the LabelGuard NanoPhotometer (Implen, München, Germany). RNA quality and quantity was further determined using a Caliper lab-on-a-chip system (Agilent – CALIPER, Hopkinton MA, USA). All isolated total RNA samples had an RNA Integrity Number (RIN) ranging from 8.5 to 10.0 (highest quality).

2.7. Library preparation and bioinformatics

DeepSuperSAGE libraries were constructed and validated by qPCR as previously described (Scheider et al., 2014a). Sequencing was performed on Illumina's Genome Analyzer IIX, and subsequent base calling was carried out by Illumina's GAPIipeline. The obtained raw data were further analyzed with GenXPro's SuperSAGE data processing pipeline. First, distinct libraries were sorted out from the bulked sequencing data according to their respective indices, followed by elimination of PCR-derived tags identified by TrueQuant technology (GenXPro). Next, 26 bp SuperTAGs were extracted from the remaining sequences, and subsequently mapped on the *Gallus gallus* genome Galgal4 (Version 72.4, published in November 2011 by the International Chicken Genome Consortium) using the short read mapper Novoalign v2.07.13 (Novocraft Technologies). Feature annotation for the mapped loci was performed on the basis of the standard Ensembl genebuild pipeline (please consult http://www.ensembl.org/info/docs/genebuild/2013_04_chicken_genebuild.pdf for a detailed description of the annotation), and tags were counted via the Python package HTSeq v0.5.4p2 (EMBL Heidelberg, <https://pypi.python.org/pypi/HTSeq>). The unambiguously mapped reads for each library were normalized to a million sequenced reads in total (tags per million; TPM). Read numbers for the pooled datasets from left and right gonads were obtained by *in silico* pooling of the raw sequencing data from the respective left and right gonad prior to the analysis via the GenXPro SuperSAGE data processing pipeline. Fold changes were determined by pair-wise comparison of the normalized tag numbers in two particular libraries, and the statistical significance was assessed by *chi* square tests according to Man and colleagues (Man et al., 2000). TPM counts of zero were adjusted to 0.05 to allow for calculation of fold changes, even if a given tag was only present in one of the libraries (see supplementary table T1).

2.8. Data accessibility

The pre-processed raw data are submitted to the Genome Expression Omnibus (Accession number: GSE108141).

3. Results and Discussion

3.1. Effect of sesame oil on gonadal differentiation and gene expression

In (eco-) toxicological studies the selection of the best suited solvent for a given substance is a critical decision. Ideally, the solvent should resolve the substance completely but should not elicit an effect on its own. Since TBT is lipophilic, we had to use an oily carrier. Because we did not want to use an emulsion of several compounds as previously described for chicken studies (Berg et al., 1998; Berg et al., 2001a; Berg et al., 2001b), we used sesame oil as solvent, which was previously applied in several vertebrate endocrine disruption studies (Chataigneau et al., 2004; Demissie et al., 2008; Fail et al., 1998; Liang et al., 2013). In other bird studies, sesame oil did not show any significant morphological effect (Eising et al., 2001; Muller et al., 2005; von Engelhardt et al., 2006). Our histological analysis revealed a slight but notable reduction in the cortex thickness of gonadal tissue from female chicken embryos treated with sesame oil (Fig. 1C), resulting in the occurrence of 21% virilized females in the solvent control compared to 0% in the untreated control (Table 1). This difference is not statistically significant (Fisher's exact test, $p = 0.061$). The treatment did not induce

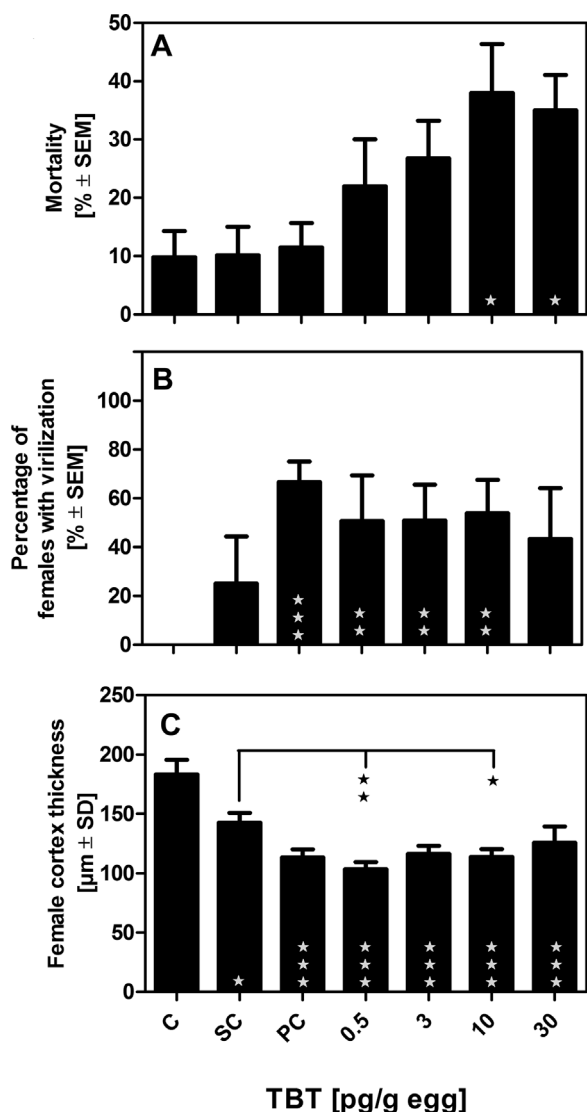


Fig. 1. Effect of TBT on chicken embryos. A: Mortality in response to TBT until embryonic day 19. B: Numbers of morphologically virilized genetic females based on structural anomalies in gonads. C: the corresponding cortex thickness of female animals. C = Control, SC = Solvent control; PC = Positive Control (MT). Statistics: 1-way ANOVA with Dunnett's Post test for A and C, Fisher's exact test for B * = p < 0.05, ** = p < 0.01; *** = p < 0.001.

any other changes in gonadal structure and was apparently non-toxic (Fig. 1A), which confirms the previous findings.

In line with the observed histological alterations, gene expression profiling of sesame oil-treated embryos revealed a strong impact of the solvent on the identified transcription profiles. In total, 417 and 606 genes were significantly differentially expressed in males and females, respectively (Fig. 4). Serum response factor (SRF) is a transcription

factor that participates in regulation of embryonic development, and is found to be down-regulated by 50% in male embryos, while its abundance in female embryos corresponds to approximately a third of its abundance in completely untreated embryos. Homeobox protein Hox-A4 (HOXA4), another transcription factor that is involved in embryonic development, is significantly down-regulated in sesame oil-treated embryos (log₂ fold change of 2 in both sexes). The deregulated expression of both *SRF* and *HOXA4* may contribute to the observed reduction of cortex thickness in female embryos, and underlines the importance of a thorough characterization of the employed solvent to account for off-target effects in toxicological studies.

3.2. Effects of TBT on gonadal morphology and differentiation based on histological alterations

In total, gonadal morphology and differentiation on E19 was analyzed in 241 embryos in six test series. At the two highest TBT doses (10 and 30 pg TBT-Sn/g egg) mortality increased significantly by more than 30% relative to the untreated and the solvent control (approx. 10%, Fig. 1A). Embryos often died before embryonic day 7 at first candling.

In all TBT and the MT (positive control) exposed groups anatomical virilization of female gonads was observed. Virilization comprised the development of a longer right gonad and/or a rounder (less folded and less flat) left gonad (Figs. Fig. 1B, Figure 2B), resembling anatomical characteristics of a developing ovotestis (Koba et al., 2008). On the histological level, virilization effects were mainly characterized by a significant reduction of the cortex (Fig. 1C, Fig. 2D + E). Overall, around 50% of the female embryos were affected by virilization of the gonads in the three lower TBT exposure groups (0.5, 3 and 10 pg/g), while 30% were affected by the highest TBT dose (30 pg/g) and 68% in the positive control (30 pg MT/g) (Table 1). Both, the lacking significance of cortex reduction (regarding 3 and 30 pg/g) and the decrease in the percentage of virilization in the ovaries of females from the higher exposure groups does not necessarily reflect a reduced effect of higher concentrations of TBT, but might be linked either with the increasing dose-dependent mortality rate of exposed embryos (Fig. 1a), or related to the typical non-monotonic dose-response relationship of endocrine disrupters, where the effect is not increasing in a linear way but characterized for example by an u-shaped (Fig. 1C) or inverted u-shaped (Fig. 1B) response (Lagarde et al., 2015; Vandenberg et al., 2012) Contrary to ovaries, testes did not exhibit any anatomical or histological alterations in the TBT-treated groups and the positive control when compared to the untreated and solvent control (Fig. 2C + F).

3.3. Gene expression profiling

Of the sequenced 32.2 million reads 85% could be mapped to the chicken genome. In total 14,074 genes are represented by unambiguously mapped reads that did not return more than one hit (supplementary tab T1). As previously reported, gene expression in the gonads of untreated embryos strongly differs between sexes and between the left and right testes and ovaries (Scheider et al., 2014a).

Table 1

Total number of injected fertile eggs, surviving embryos until E 19, number of genetic males and females and number and proportion of virilized females in the different treatment groups. Virilized females exhibited a thinner cortex and/or at least 10 Tubuli seminiferi in histological sections of the gonad. Embryos that died before E19 are not listed.

	Σ fertile eggs	Σ surviving embryos	Σ genetic male	Σ genetic female	Σ virilized females (%)
Untreated control	51	47	27	20	0 (0)
Solvent Control	31	27	13	14	3 (21)
MT 30 ng/g egg	54	48	23	25	17 (68)
TBT-Sn 0.5 pg/g egg	40	33	14	19	10 (53)
TBT-Sn 3 pg/g egg	45	34	18	16	10 (63)
TBT-Sn 10 pg/g egg	44	28	10	18	8 (44)
TBT-Sn 30 pg/g egg	36	24	14	10	3 (30)

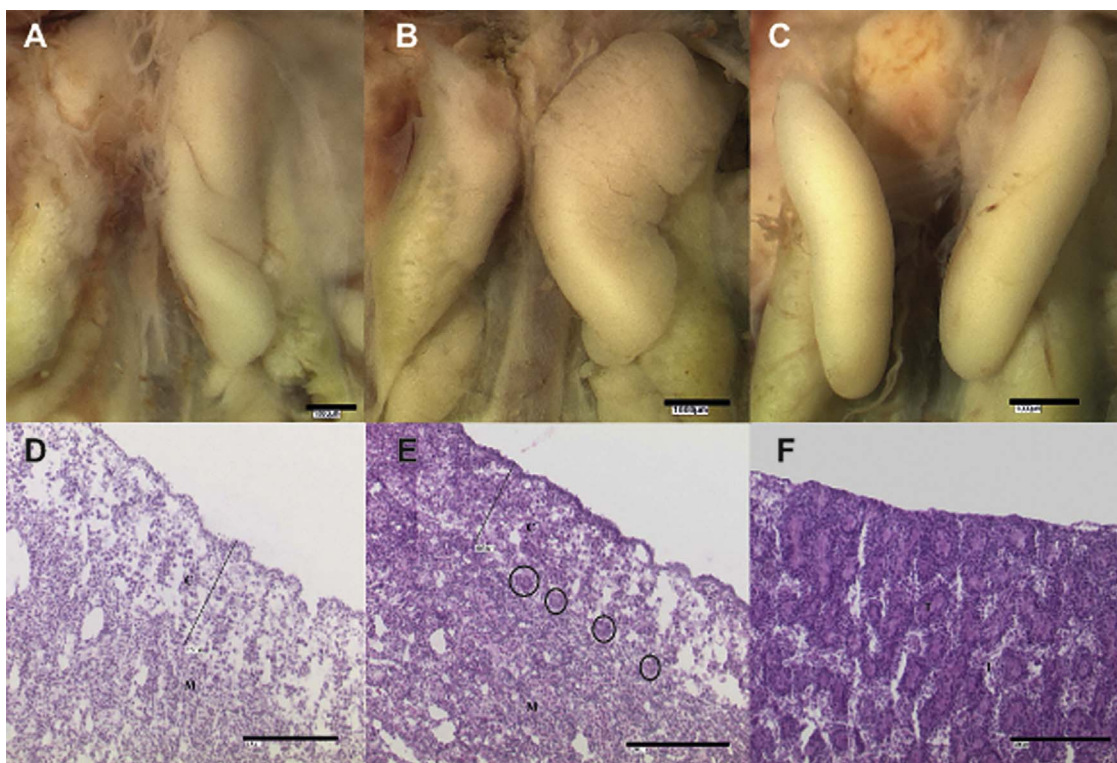


Fig. 2. Morphological (A-C; bar = 1 mm) and histological (D-F; bar = 200 μm) photographs of gonads in chicken embryos (E19) A + D: Control female with large and folded left and regressing right gonad, section through left gonad with cortex and medulla. B + E: Genetic female (10 pg TBT-Sn/g egg) with masculinized gonads: the left gonad gets rounder, more firm, and the right gonad gets taller. The section indicates Tubuli seminiferi in the outer medulla region (encircled) and a reduced cortex. C + F: Control male with two uniform testes and seminiferous cords and interstitial space.

Fig. 3 illustrates the most differentially expressed genes between the sexes in control as well as solvent, TBT or MT-treated chicken embryos. Apparently, the natural sex-specific gene expression is only partially continued in the response pattern caused by the exposure to the test chemicals. Most of the affected genes are activated or inactivated regardless of the sex, but some genes exhibit a sex-dependent differential expression under substance influence, partially differing between MT and TBT.

3.4. MT-induced changes in gonadal differentiation and gene expression

MT is the equivalent of endogenous testosterone, which is transformed to estrogen by the aromatase enzyme. In female embryos, the natural level of estrogen is higher than the testosterone level due to an increased activity of aromatase. The balance of both, estrogen and testosterone, is crucial for normal embryonic development of gonadal tissues in males and females. In our study, the cortex of female chicken gonads was still present, but thinner in MT-treated embryos (Fig. 1C).

The change in cortex thickness in these embryos implies that the testosterone-estrogen relationship is shifted in favor of androgens such that the volume of the whole gonad is changed together with cortex thickness, while the gonad is not completely sex-reversed. Apparently, only complete left-side ovariectomy (Wallenburg, 1982) or *in ovo* treatment with the high-potential, non-steroidal aromatase inhibitor fadrozole (Abinawanto et al., 1998; Vaillant et al., 2001; Wartenberg et al., 1992) results in embryonic phenotypic female-to-male sex-reversal. The latter, however, has to be maintained by further treatment within juvenile development, otherwise this transformation is reversible in mature birds (Burke and Henry, 1999). Additionally, sex-reversed female chicken cannot be transformed into completely functional neo-males (Abinawanto et al., 1998; Vaillant et al., 2003; Yang et al., 2011). We therefore conclude that the *in ovo* application of 30 pg MT/g egg does generally not influence the development of the female gonad up to a neo-male, but nevertheless induces histomorphological changes of the tissue.

Even though MT affected development in several studies with

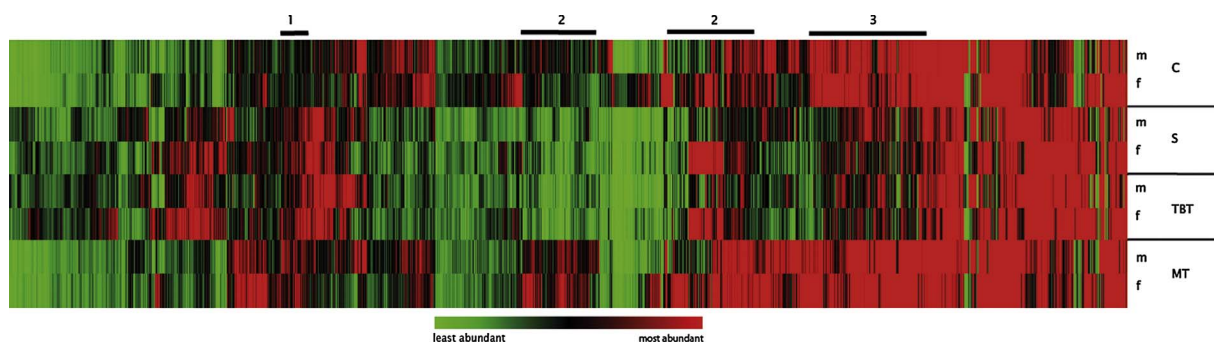


Fig. 3. Heat map of the most differential gene expression in the gonads of genetic males and females. $p_{max} < 9E^{-3}$, hierarchical clustering. 1 = S, TBT and MT differ from C, 2 = S, TBT and MT differ from C sex-dependently, 3 = S and TBT differ from MT and C.

		MT	TBT	SC	C	
males	C	217	706	↑317 ↓439	↑230 ↓521	↑271 ↓263
	SC	↑268 ↓149	46	82	↑6 ↓9	↑393 ↓169
	TBT	↑292 ↓188	↑25 ↓13	86	79	↑457 ↓149
	MT	↑132 ↓160	↑203 ↓315	↑402 ↓282	1,111	559
						females
	C	SC	TBT	MT		

Fig. 4. Pair-wise comparison of differentially expressed transcripts in male (left) and female (right) gonads along with the number of exclusively expressed transcripts (gray numbers) for each group. Listed are unambiguously annotated reads with log₂ fold changes stronger than |1.5| and p-values below 0.000001. Up- and downregulated transcripts are indicated by corresponding arrows for the library on the ordinate, respectively. Please consult Fig. 1 for further information.

different taxa (Cevasco et al., 2008; Faucounau et al., 1995; Feist et al., 1995; Giusti et al., 2013), MT and testosterone propionate did not have any morphological effects on the gonads of treated male and female quails (Shibuya et al., 2004; Utsumi and Yoshimura, 2009). In addition to the observed reduction of cortex thickness in our study, several MT- and TBT-treated females showed *Tubuli seminiferi* in the medulla, especially close to the cortex (Fig. 2E), and this did not occur in control and solvent-treated embryos. Our results therefore deviate from the studies in quails and confirm the findings of the androgen studies that reported an impact of MT during development. We assume that the technique of injection of the substance, the day of application of the compound as well as the microscopic analysis might be possible causes for this. Firstly, we injected the endocrine disrupter directly into the yolk, just below the embryo, while the injection mode in the quails studies (Shibuya et al., 2004; Utsumi and Yoshimura, 2009) was either into the egg white or into the air cell. Secondly, we injected on embryonic day 1 to imitate the maternal transfer and to fully assess the impact of our tested compounds during the whole embryonic development. Contrasting to this, Utsumi and colleagues (Utsumi and Yoshimura, 2009) applied the substance on embryonic day 13, followed by histological examination only three days later. The substances were therefore available for a shorter period compared to our study. Moreover, we administered the substance at a much earlier stage of development where changes in a few genes in the few cells that represent the gonads at E1 may have effects that have consequences in all subsequent cell divisions. Additionally, we processed an intensive histological investigation which was not considered in the other studies.

Gene expression profiling of gonadal tissue from male and female embryos subsequent to MT treatment indicates that the exposure to MT evokes transcriptional alterations that are distinct from those induced by the solvent. In comparison to the sesame oil-treated group more than 200 genes were significantly upregulated in both sexes, while 315 and 521 genes are downregulated in male and female chicken embryos, respectively (Fig. 4). Among the transcripts that are upregulated in both sexes upon MT treatment are the mRNAs that encode the two transcription factors V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog F (MAFF) and transcription factor CP2 (TFCP2). Both are involved in embryonic development, and especially TFCP2 is known to regulate expression in chicken embryonic stem cells via activation of the cENS-1 promoter (Acloque et al., 2004; Lecoin et al., 2004). We additionally found a highly significant upregulation of the gene encoding (Sex Determining Region Y)-Box 9 (SOX9) in MT-treated males compared to the solvent control. SOX9, a transcription factor related to the mammalian testis-determining factor SRY, is expressed shortly after

the Anti-Mullerian Hormone, which represents a key player for sexual differentiation (Oréal et al., 1998), and was identified as androgen-responsive gene in the trout testis (Rolland et al., 2013). Transforming Growth Factor Beta 3 (TGFB3) is involved in embryonic gonadal development (Memon et al., 2008), and the encoding mRNA is strongly downregulated in both sexes after MT treatment.

In our precedent study the mRNA encoding Gallinacin 10 (GAL10) was highly differential expressed between the sexes with an increased expression in the ovaries (Scheider et al., 2014b). Here, we report a dramatic, about 10-fold upregulation of *GAL10* transcription in male MT-treated embryos compared to the solvent control group while in female embryos it is not even doubled. The sex-dependent changes in *GAL10* expression therefore reflect the hormonal imbalance that leads to the observed histomorphological changes of gonad tissue in MT-treated chicken embryos. Taken together, the MT-induced differential expression seems to affect embryonic development by altered expression of important transcription factors such as MAFF, TFCP2, and SOX9, which in turn affect expression of secreted proteins such as GAL10.

3.5. Altered gonadal differentiation and gene expression in TBT-treated chicken embryos

TBT affects embryonic tissue in two different ways: the toxic and the hormonal component. Egg mortality increased significantly after treatment with the two highest TBT doses, which is clearly linked to increased toxicity. The second component of TBT is the hormonal reaction. As with MT, the cortex of female chicken gonads is generally thinner in TBT-treated embryos and likewise several females developed seminiferous cords in the medulla.

On the transcriptional level we find a significantly increased expression of *GAL10* in both sexes subsequent to TBT treatment compared to the solvent control whereof the male gonads reacted most prominently (Table 2). The upregulation in gonadal tissue from male embryos that were exposed to TBT corresponds to the 10-fold upregulation that is present subsequent to MT treatment. Interestingly, MT-treated female embryos do not show a strong differential expression of *GAL10*, while TBT treatment evokes a 3.3-fold upregulation. The fact that MT and TBT-treated males show an almost identical expression pattern of *GAL10*, which was previously identified as sex-specifically expressed in female chicken embryos, is an indicator of the hormonal reaction that is evoked by exposure to TBT. Two other members of the antimicrobial gallinacin family react to TBT treatment in a sex-dependent manner. The mRNAs encoding *GAL1* and *GAL6* are significantly downregulated after TBT treatment in females, while expression in male embryos is not

Table 2

Fold change of selected pluripotency and differentiation markers in response to MT and TBT in male and female gonads relative to the solvent control (S) in SuperSAGE data. Bonferroni correction * $p < 0.1$ ** $p < 0.5$ *** $p < 0.01$, ns = not significant, na = not available, red = upregulated, green = downregulated.

gene symbol	male				female			
	S-MT		S-TBT		S-MT		S-TBT	
CTCF	1.12	ns	1.37	ns	-1.14	ns	2.20	***
CTGF	1.05	ns	1.66	ns	-1.49	ns	2.54	***
CYP19A1	221.92	ns	na	na	-1.21	ns	-1.34	ns
FGF12	-3.13	***	-1.15	ns	-1.53	ns	2.57	***
GAL1	1.53	**	2.00	ns	1.16	ns	-2.29	***
GAL10	9.75	***	11.57	*	1.36	***	3.33	***
GAL6	1.03	ns	-1.55	ns	-2.01	***	-3.31	***
HSP70	-7.40	***	-1.57	ns	-6.54	***	-1.95	ns
MAFF	34.20	***	1.94	ns	2339.40	***	102.88	ns
NFIB	1.04	ns	9.87	***	-7.27	***	1.58	***
SOX9	3.97	***	-1.72	ns	272.62	ns	102.88	ns
TFCP2	14.29	***	-	ns	6.49	ns	-63.54	ns
TGFB3	-12.03	***	1.33	ns	-10.02	***	4.20	ns

affected. Since *GAL6* is also significantly downregulated in MT-treated female embryos, downregulation of this gene is likely linked with the endocrine potential of TBT by provoking female-specific genes to be expressed in males. Downregulation of *GAL1*, on the other hand, might contribute to the stress response that is evoked by the toxic component of TBT.

The genes encoding connective tissue growth factor precursor (CTGF) and fibroblast growth factor 12 (FGF12) also display a sex-dependent differential expression subsequent to TBT treatment. The abundance of the mRNAs encoding both growth factors is significantly changed by the treatment and found to be more than doubled in female embryos. In contrast to the increased expression of *FGF12* in TBT-treated females, *FGF12* is also downregulated in gonadal tissue from MT-treated male embryos. Both growth factors are involved in embryogenesis and the increased expression might therefore contribute or result from the altered cortex structure that is observed in gonadal tissue from TBT-treated females at E19 (Pizette and Niswander, 1999). CCCTC-Binding Factor (CTCF) is an important transcriptional regulator that binds to tens of thousands of genomic sites in mammalian cells (Holwerda and de Laat, 2013), and the encoding mRNA is significantly upregulated in female gonad tissue compared to the solvent control. TGGCA-Binding Protein (NFIB) represents another important transcriptional regulator that is differentially expressed between the sexes subsequent to TBT treatment. The encoding mRNA is approximately 10-fold more abundant in male embryos in comparison to the sesame oil-treated group, but there is no differential expression between the corresponding female groups. However, we find an almost 7-fold downregulation of *NFIB* in gonadal tissue from MT-treated female embryos compared to the solvent control. TBT thus seems to evoke a contrary differential expression of *NFIB* in exposed female embryos as in MT-treated male embryos.

Interestingly, aromatase (CYP19A1) expression seems to be affected only by the solvent control. While its expression is increased about 4-fold subsequent to injection of the solvent, no significant differences are evoked by additional injection of TBT or MT. Since TBT is known to inhibit aromatase activity this implies that the induced expression of *CYP19A1* by the applied solvent forestalls a further differential expression or that this response has already passed by at embryonic day 19 (Bruggeman et al., 2002).

Other surveys that investigated the influence of organotin compounds on RNA expression generally focused on a small set of

predefined genes. One of the few studies with a bigger set of genes was a 24 hour exposure of adult tunicates to 100 nM TBT where the expression of 13,400 protein coding genes was tested on a cDNA microarray (Azumi et al., 2004). Subsequent analysis revealed the differential expression of genes that are mainly involved in stress responses and detoxification. Due to the lack of a positive control the hormonal component of the reaction could not be determined in the data, and apparently the applied concentration of 100 nM of TBT already caused strong toxic effects. Among the stress-responsive genes in tunicates were members of the cytochrome P450 family as well as the 70 kd heat shock protein (HSP70). Although there are some indications for differentially expressed mRNAs that encode cytochrome P450 none of these genes exhibit any significant differential expression in comparison to the solvent control in our survey. *HSP70*, on the other hand, exhibits a strong differential expression in gonadal tissue from MT-treated embryos of both sexes, but also in tissue from the solvent control group. However, we did not detect a significant deregulation of *HSP70* expression in the TBT- groups.

4. Conclusions

Individuals are often most sensitive to endocrine disruptors in their early life stages (embryos, fetuses and juveniles). During these stages, endocrine disruptors interfere with developmental and organizational processes such as sexual differentiation (see e.g. (Ankley and Johnson, 2004; Holwerda and de Laat, 2013; Rolland et al., 2013)). In contrast to mammals, where steroid synthesis is initiated in the gonads after the termination of their differentiation, estrogen synthesis in birds begins in undifferentiated embryo gonads, which are thus more sensitive to hormonal manipulation (Trukhina et al., 2015). Exposure during this critical window of development may induce effects on sexual differentiation which are irreversible and thus persist in later life, whereas identical exposure levels during adulthood often result in temporary and reversible alterations of reproductive performance or of somatic parameters (Nichols et al., 2011). However, effects of early life stage exposures may only become apparent in the sexually mature organisms during the reproductive phase (Matthiessen and Johnson, 2007; Nichols et al., 2011). In view of their potentially serious consequences such delayed irreversible effects cause greatest concern (Si et al., 2012).

The present study provides the first survey linking the morphological alterations of gonadal tissue from chicken embryos that are induced by the known endocrine disrupter TBT with the underlying gene expression. We applied a single test compound injection at a very early developmental phase to simulate maternal transfer of the organotin compound. This treatment results in virilization of female gonads in a significant number of individuals and allowed us to identify differentially expressed transcription and growth factors that are associated with this phenotype in E19 embryos. Although the effect of the solvent cannot be neglected, MT that served as positive control allowed for discrimination of the toxic and hormonal effects induced by TBT. Surprisingly, we identified an aberrant expression of sex-dependent genes such as *GAL10*, but not of the mRNA encoding the TBT-inhibited aromatase. Since gonad development is well progressed at E19 aromatase inhibition might have already been compensated for. Our following studies will therefore aim to elucidate the transcriptional landscape after exposure to endocrine disruptive compounds in earlier embryonic stages of *Gallus gallus*. The final goal is to find parallel gene expression shifts in younger embryos to find a technique for an animal replacement study within the scope of a potential new 3R animal replacement method (Russel and Burch, 1959).

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

The authors thank Sabrina Giebner and Cornelia Geiß, University of Frankfurt, for assistance in preparation of the tissues, and Ruth Jüngling and Anne Plötner, University of Frankfurt, for technical advice as well as Nico Krezdorn and Lukas Jost, GenXPro, for handling of big datasets.

This research was financially supported in the framework of Hessen Modellprojekte (HA project no. 155/08-11), financed with funds of LOEWE (State Offensive for the Development of Scientific and Economic Excellence) – Förderlinie 3: KMU-Verbundvorhaben and by the BMBF (Fördermaßnahme: Ersatzmethoden zum Tierversuch, FKZ 031A104A/B).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.019>.

References

- Abinawanto, Sai, C., Zhang, N., Matsuda, Y., Shimada, K., 1998. Identification of sperm-bearing female-specific chromosome in the sex-reversed chicken. *J. Exp. Zool.* 280 (1), 65–72. PubMed PMID: WOS000071437100008.
- Acloque, H., Mey, A., Birot, A.M., Gruffat, H., Pain, B., Samarut, J., 2004. Transcription factor cCP2 controls gene expression in chicken embryonic stem cells. *Nucl. Acids Res.* 32 (7), 2259–2271. PubMed PMID: 15107494.
- Ahn, R.S., Han, S.-J., Kim, S.C., Kwon, H.B., 2007. Effects of butyltin compounds on follicular steroidogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24 (2), 149–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2007.04.005>. PubMed PMID: WOS:000248980700011.
- Alzieu, C., 2000. Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* 9 (1–2), 71–76. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1008968229409>. PubMed PMID: WOS:000088654100008.
- Ankley, G.T., Johnson, R.D., 2004. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR J.* 45 (4), 469–483. PubMed PMID: WOS:000224480300010.
- Antizar-Ladislao, B., 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environ. Int.* 34 (2), 292–308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.005>.
- Azumi, K., Fujie, M., Usami, T., Miki, Y., Satoh, N., 2004. A cDNA microarray technique applied for analysis of global gene expression profiles in tributyltin-exposed ascidians. *Mar. Environ. Res.* 58 (2–5), 543–546. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.042>. PubMed PMID: WOS000222199100063.
- Bannister, S.C., Smith, C.A., Roeszler, K.N., Doran, T.J., Sinclair, A.H., Tizard, M.L.V., 2011. Suppression of estrogen synthesis alters MIR202* expression in embryonic chicken gonads. *Biol. Reprod.*
- Berg, C., Halldin, K., Brunstrom, B., Brandt, I., 1998. Methods for studying xenoestrogenic effects in birds. *Toxicol. Lett.* 103, 671–676. PubMed PMID: WOS:000078462400110.
- Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, A.K., Brandt, I., Brunstrom, B., 1999. The avian egg as a test system for endocrine disruptors: Effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Sci. Total Environ.* 233 (1–3), 57–66. PubMed PMID: WOS:000082518900006.
- Berg, C., Halldin, K., Brunstrom, B., 2001a. Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (12), 2836–2840. PubMed PMID: WOS:000172420700024.
- Berg, C., Holm, L., Brandt, I., Brunstrom, B., 2001b. Anatomical and histological changes in the oviducts of Japanese quail, *Coturnix japonica*, after embryonic exposure to ethynylestradiol. *Reproduction* 121 (1), 155–165. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1210155>. PubMed PMID: WOS:000168328900016.
- Bruggeman, V., Van As, P., Decuyper, E., 2002. Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Compar. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* 131 (4), 839–846. PubMed PMID: WOS:000174594600016.
- Burke, W., Henry, M., 1999. Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. *Poultry Sci.* 78 (7), 1019–1033. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/78.7.1019>.
- Carere, C., Balthazart, J., 2007. Sexual versus individual differentiation: the controversial role of avian maternal hormones. *Trends Endocrinol. Metab.* 18 (2), 73–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2007.01.003>. PubMed PMID: WOS:000245067900006.
- Cevasco, A., Urbatzka, R., Bottero, S., Massari, A., Pedemonte, F., Kloas, W., et al., 2008. Endocrine disrupting chemicals (EDC) with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: II. Effects on gonad histomorphology. *Compar. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 147 (2), 241–251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.10.001>.
- Chataigneau, T., Zerr, M., Chataigneau, M., Hudlett, F., Hirm, C., Pernet, F., et al., 2004. Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats. *Menopause – J. N. Am. Menopause Soc.* 11 (3), 255–263. <http://dx.doi.org/10.1097/01.gme.0000097847.95550.e3>. PubMed PMID: WOS000221395400005.
- Chau, Y.K., Maguire, R.J., Brown, M., Yang, F., Batchelor, S.P., Thompson, J.A.J., 1997. Occurrence of butyltin compounds in mussels in Canada. *Appl. Organomet. Chem.* 11 (10–11), 903–912. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0739\(199710/11\)11:10/11<903:AID-AOC658>3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-0739(199710/11)11:10/11<903:AID-AOC658>3.0.CO;2-C).
- Cunha, G.R., Ricke, W., Thomson, A., Marker, P.C., Risbridger, G., Hayward, S.W., et al., 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92 (4), 221–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.017>. PubMed PMID: WOS:000227022500002.
- Davies, I.M., Harding, M.J.C., Bailey, S.K., Shanks, A.M., Lange, R., 1997. Sublethal effects of tributyltin oxide on the dogwhelk *Nuccella lapillus*. *Mar. Ecol. Prog. Series* 158, 191–204. <http://dx.doi.org/10.3354/meps158191>. PubMed PMID: WOS:A1997YK60700017.
- Demissie, M., Lazic, M., Foecking, E.M., Aird, F., Dunaif, A., Levine, J.E., 2008. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (2), E264–E268. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90208.2008>.
- Dmetrichuk, J.M., Carlone, R.L., Jones, T.R.B., Vesprini, N.D., Spencer, G.E., 2008. Detection of endogenous retinoids in the molluscan CNS and characterization of the trophic and tropic actions of 9-cis retinoic acid on isolated neurons. *J. Neurosci.* 28 (48), 13014–13024. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3192-08.2008>. PubMed PMID: WOS:000261191700043.
- Dubey, S.K., Roy, U., 2003. Review Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Appl. Organomet. Chem.* 17 (1), 3–8. <http://dx.doi.org/10.1002/aoc.394>.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotins in foodstuffs (Question N(EFSA-Q-2003-110) 2004.
- Eising, C.M., Eikenaar, C., Schwabl, H., Groothuis, T.G.G., 2001. Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 268 (1469), 839–846. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2001.1594>.
- Fail, P.A., Hines, J.W., Zacharewski, T., Wu, Z.F., Borodinsky, L., 1998. Assessment of polystyrene extract for estrogenic activity in the rat uterotrophic model and an in vitro recombinant receptor reporter gene assay. *Drug Chem. Toxicol.* 21, 101–121. <http://dx.doi.org/10.3109/01480549809007405>. PubMed PMID: WOS:000078668100006.
- Faucounau, N., Ichas, F., Stoll, R., Maraud, R., 1995. Action of testosterone on the estradiol-induced feminization of the male chick-embryo. *Anat. Embryol.* 191 (4), 377–379. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00534691>. PubMed PMID: WOSA1995QM21700011.
- Feist, G., Yeoh, C.G., Fitzpatrick, M.S., Schreck, C.B., 1995. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17-alpha-Methyltestosterone and 11-beta-Hydroxyandrostendione. *Aquaculture* 131 (1–2), 145–152. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00336-m](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(94)00336-m). PubMed PMID: WOS:A1995QN19600013.
- Fridolfsson, A.K., Ellegren, H., 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avian Biol.* 30 (1), 116–121. PubMed PMID: WOS:000079569700017.
- Gadd, G.M., 2000. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *Sci. Total Environ.* 258 (1), 119–127. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00512-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00512-X).
- Giusti, A., Leprince, P., Mazzucchelli, G., Thome, J.P., Lagadic, L., Ducrot, V., et al., 2013. Proteomic analysis of the reproductive organs of the hermaphroditic gastropod *Lymnaea stagnalis* exposed to different endocrine disrupting chemicals. *Plos One* 8 (11). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081086>. PubMed PMID: WOS:000327311900114.
- Gooding, M.P., LeBlanc, G.A., 2001. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *General Comp. Endocrinol.* 122 (2), 172–180. <http://dx.doi.org/10.1006/gcen.2001.7630>. PubMed PMID: WOS:000168466300006.
- Gooding, M.P., Wilson, V.S., Folmar, L.C., Marcovich, D.T., LeBlanc, G.A., 2003. The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environmental Health Perspectives.* 111 (4), 426–430. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.5779>. PubMed PMID: WOS:000182144300026.
- Guruge, K.S., Iwata, H., Tanaka, H., Tanabe, S., 1997. Butyltin accumulation in the liver and kidney of seabirds. *Mar. Environ. Res.* 44 (2), 191–199. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00001-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00001-9).
- Heidrich, D.D., Steckelbroeck, S., Klingmuller, D., 2001. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids* 66 (10), 763–769. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X\(01\)00108-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X(01)00108-8).
- His, E., Robert, R., 1985. Développement des véligrères de *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon études sur les mortalités larvaires. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 47 (1–2), 63–88. PubMed PMID: ZOOREC:ZOOR12200053784.
- Holwerda, S.J., de Laat, W., 2013. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 368 (1620), 20120369. Epub 2013/05/08. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0369>. PubMed PMID: 23650640; PubMed Central PMCID: PMC3682731.
- Jessl, L., Scheider, J., Oehlmann, J., 2017. The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for animal experiments – baseline experiments to determine parameter variability in control groups. *BMC Dev. Biol.* under revision.
- Kamata, R., Takahashi, S., Shimizu, A., Shiraiishi, F., 2006. Avian transgenerational reproductive toxicity test with in ovo exposure. *Arch. Toxicol.* 80 (12), 846–856. PubMed PMID: WOS:000242334300009.
- Kannan, K., Falandysz, J., 1997. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 34 (3), 203–207. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(96\)00146-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00146-4).
- Kannan, K., Senthilkumar, K., Elliott, J.E., Feyk, L.A., Giesy, J.P., 1998. Occurrence of Butyltin Compounds in Tissues of Water Birds and Seabirds from the United States and Canada. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 (1), 64–69. <http://dx.doi.org/10.1007/s002449900350>.
- Koba, N., Mori, M., Ha, Y., Mizushima, S., Tsukada, A., Saito, N., et al., 2008. Effects of aromatase inhibitor (Fadrozole)-induced sex-reversal on gonadal differentiation and

- mRNA expression of p450arom, AMH and ER alpha in embryos and growth in posthatching quail. *J. Poult. Sci.* 45 (2), 116–124 PubMed PMID: WOS:000255308400005.
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S.M., Belzunces, L.P., Emond, C., Guerbet, M., et al., 2015. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ. Health* 14 (1), 13. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069x-14-13>.
- Lecoin, L., Sii-Felice, K., Pouponnot, C., Eychene, A., Felder-Schmittbuhl, M.P., 2004. Comparison of male gene expression patterns during chick embryo development. *Gene Express. Patterns* 4 (1), 35–46 Epub 2003/12/18. PubMed PMID: 14678826.
- Liang, T., Ouyang, J., Yi, L., Chu, Y., Liu, C., 2013. Behavioral changes of rats after short-term exposure to di-(2-ethyl hexyl) phthalate. *J. South. Med. Univ.* 33 (3), 401–405 PubMed PMID: MEDLINE:23529240.
- Man, M.Z., Wang, X., Wang, Y., 2000. POWER SAGE: Comparing statistical tests for SAGE experiments. *Bioinformatics* 16 (11), 953–959. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/16.11.953>.
- Marker, P.C., Donjacour, A.A., Dahiya, R., Cunha, G.R., 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* 253 (2), 165–174. [http://dx.doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00031-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00031-3). PubMed PMID: WOS:000180688400001.
- Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1), 37–43. [http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028\(1998\)017<0037:caotef>2.3.co;2](http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028(1998)017<0037:caotef>2.3.co;2). PubMed PMID: WOS:000071120200006.
- Matthiessen, P., Johnson, I., 2007. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environ. Pollut.* 146 (1), 9–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2006.05.036>. PubMed PMID: WOS:000244595200003.
- McAllister, B.G., Kime, D.E., 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 65 (3), 309–316. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x\(03\)00154-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-445x(03)00154-1). PubMed PMID: WOS:000185544500007.
- Memon, M.A., Anway, M.D., Covert, T.R., Uzumcu, M., Skinner, M.K., 2008. Transforming growth factor beta (TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3) null-mutant phenotypes in embryonic gonadal development. *Mol. Cell Endocrinol.* 294 (1–2), 70–80 Epub 2008/09/16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2008.08.017>. PubMed PMID: 18790002; PubMed Central PMCID: PMC2593935.
- Muller, W., Groothuis, T.G.G., Eising, C.M., Dijkstra, C., 2005. An experimental study on the causes of sex-biased mortality in the black-headed gull – the possible role of testosterone. *J. Anim. Ecol.* 74 (4), 735–741. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2656.2005.00964.x>. PubMed PMID: WOS:000230601800018.
- Nakanishi, T., J-i, Nishikawa, Tanaka, K., 2006. Molecular targets of organotin compounds in endocrine disruption: Do organotin compounds function as aromatase inhibitors in mammals? *Environ. Sci. Technol.* 40 (2), 89–100 PubMed PMID: BCI:BCI200600607848.
- Nichols, J.W., Reen, M., Denver, R.J., Distefano, J.J., Edwards, J.S., Hoke, R.A., et al., 2011. Predicting chemical impacts on vertebrate endocrine systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (1), 39–51.
- Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraiishi, F., Horiguchi, T., 2004. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ. Sci. Technol.* 38 (23), 6271–6276. <http://dx.doi.org/10.1021/es049593u>. PubMed PMID: WOS:000225532900022.
- OECD. Detailed review paper (DRP) on mollusc life-cycle toxicity testing. OECD Series on Testing and Assessment No. 121. ENV/JM/MONO(2010)9. 2010.
- Oberdörster, E., McClellan-Green, P., 2000. The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21 (9), 1323–1330. [http://dx.doi.org/10.1016/s0196-9781\(00\)00274-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0196-9781(00)00274-6). PubMed PMID: WOS:000165202000003.
- Oehlmann, J., Bauer, B., Minchin, D., Schulte-Oehlmann, U., Fioroni, P., Markert, B., 1998. Imposex in *Nuccella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: Interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. *Hydrobiologia* 378, 199–213. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1003218411850>. PubMed PMID: WOS:000078311300023.
- Oréal, E., Pieau, C., Mattei, M.G., Josso, N., Picard, J.Y., Carre-Eusebe, D., et al., 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev. Dyn.* 212 (4), 522–532 PubMed PMID: MEDLINE:9707325.
- Pizette, S., Niswander, L., 1999. BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126 (5), 883–894.
- Ricke, W.A., Ricke, E.A., Simko, J., Cunha, G.R., 2004. Antiandrogens act as chemopreventives in prostate cancer progression. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.* 13 (11), 1839S PubMed PMID: WOS:000225073100043.
- Rodríguez-González, P., Encinar, J.R., Alonso, J.I.G., Sanz-Medel, A., 2006. Contamination of the Coastal Waters of Gijón (North West Spain) by Butyltin Compounds. *Water, Air, Soil Pollut.* 174 (1), 127. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-005-9057-y>.
- Rolland, A.D., Lardenois, A., Goupil, A.S., Lareyre, J.J., Houlgatte, R., Chalmel, F., et al., 2013. Profiling of androgen response in rainbow trout pubertal testis: relevance to male gonad development and spermatogenesis. *Plos One* 8 (1), e53302 Epub 2013/01/10. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053302>. PubMed PMID: 23301058; PubMed Central PMCID: PMC3536770.
- Russel W, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique. Reprinted by UFAW, 1992: 8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England ed. Methuen, editor. London 1959. 0
- Scheider, J., Afonso-Grunz, F., Hoffmeier, K., Horres, R., Groher, F., Rycak, L., et al., 2014a. Gene expression of chicken gonads is sex- and side-specific. Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation. *Sex. Dev.* 8 (4), 178–191. <http://dx.doi.org/10.1159/000362259>. PubMed PMID: MEDLINE:24820130.
- Scheider, J., Afonso-Grunz, F., Hoffmeier, K., Horres, R., Groher, F., Rycak, L., et al., 2014b. Gene expression of chicken gonads is sex- and side-specific. *Sex. Dev.* 8 (4), 178–191 Epub 2014/05/14. <http://dx.doi.org/10.1159/000362259>. PubMed PMID: 24820130.
- Scholz, S., Sela, E., Blaha, L., Braunbeck, T., Galay-Burgos, M., García-Franco, M., et al., 2013. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* 67 (3), 506–530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.10.003>.
- Sekizawa Jun, Suter II Glenn, Linda B. 2017 Case study: Tributyltin and triphenyltin compounds: WHO/IPCS/IRA/01/12; 2001. Available from: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/ira/en/.
- Shibuya, K., Mizutani, M., Wada, M., Sato, K., Nunoya, T., 2004. A new screening model using F1(AWE x WE) Japanese quail embryo for evaluating sex reversal effects. *J. Toxicol. Pathol.* 17, 245–252.
- Si, J., Han, X., Zhang, F., Xin, Q., An, L., Li, G., et al., 2012. Perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride advances puberty and affects patterns of estrous cyclicity in female mice. *Environ. Toxicol.* 27 (11), 662–670. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.21756>.
- Singh, A.K., 2013. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *Gen. Compar. Endocrinol.* 181 (0), 146–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.08.027>.
- Stäb, J.A., Traas, T.P., Stroomborg, G., van Kesteren, J., Leonards, P., van Hattum, B., et al., 1996. Determination of organotin compounds in the foodweb of a shallow freshwater lake in The Netherlands. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31 (3), 319–328. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00212670>.
- Stroben, E., Oehlmann, J., Fioroni, P., 1992. *Hinia reticulata* and *Nuccella lapillus* – comparison of 2 gastropod tributyltin bioindicators. *Mar. Biol.* 114 (2), 289–296. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00349532>. PubMed PMID: WOS:A1992JV69000016.
- Trukhina, A.V., Lukina, N.A., Nekrasova, A.A., Smirnov, A.F., 2015. Sex inversion and epigenetic regulation in vertebrates. *Russ. J. Genet.* 51 (3), 231–237. <http://dx.doi.org/10.1134/s1022795415020155>. PubMed PMID: WOS:000351529900002.
- Utsumi, T., Yoshimura, Y., 2009. Sensitive embryonic endpoints with in ovo treatment for detecting androgenic and anti-androgenic effects of chemicals in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Poult. Sci.* 88 (5), 1052–1059. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2008-00326>. PubMed PMID: WOS:000265405900023.
- Vaillant, S., Magre, S., Dorizzi, M., Pieau, C., Richard-Mercier, N., 2001. Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Dev. Dyn.* 222 (2), 228–237 PubMed PMID: WOS:000171382200009.
- Vaillant, S., Guemene, D., Dorizzi, M., Pieau, C., Richard-Mercier, N., Brillard, J.P., 2003. Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (*Gallus domesticus*) treated with fadrozole. *Mol. Reprod. Dev.* 65 (4), 420–428 PubMed PMID: WOS:000184122500009.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, J.D.R., Lee, D.-H., et al., 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Rev.* 33 (3), 378–455. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2011-1050>.
- Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., van den Heuvel-Greve, M.J., Vethaak, A.D., Hendriks, A.J., 2006. Organotin accumulation in an estuarine food chain: Comparing field measurements with model estimations. *Mar. Environ. Res.* 61 (5), 511–530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.02.005>.
- Wallenburg, J., 1982. Macroscopy, light and electron microscopy studies on the genesis and function of the gonads after experimental sex-reversal following left-side ovariectomy of hen chicks (*Gallus domesticus*). *Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch* 128 (4), 463–529 PubMed PMID: MEDLINE:6891351.
- Wang, X., Fang, C., Hong, H., Wang, W.-X., 2010. Gender differences in TBT accumulation and transformation in *Thais clavigera* after aqueous and dietary exposure. *Aquat. Toxicol.* 99 (3), 413–422. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.06.001>. PubMed PMID: WOS:000281493400012.
- Wartenberg, H., Lenz, E., Schweikert, H.U., 1992. Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo. *Andrologia* 24 (1), 1–6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0272.1992.tb02599.x>.
- Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Sawaki, M., Imatanaka, N., Shinoda, K., Takatsuki, M., 2003. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183 (1–3), 93–115. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00445-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00445-6).
- Yamazaki, T., Shimodaira, M., Kuwahara, H., Wakatsuki, H., Horiuchi, H., Matsuda, H., et al., 2005. Tributyltin disturbs bovine adrenal steroidogenesis by two modes of action. *Steroids* 70 (14), 913–921. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2005.06.005>. PubMed PMID: BCI:BCI200600205951.
- Yang, X., Zheng, J., Qu, L., Chen, S., Li, J., Xu, G., et al., 2011. Methylation status of cMmH and expression of sex-specific genes in adult sex-reversed female chickens. *Sex. Dev.* 5 (3), 147–154. <http://dx.doi.org/10.1159/000327712>. PubMed PMID: WOS:000291350600006.
- Zhang, J., Zuo, Z., Chen, Y., Zhao, Y., Hu, S., Wang, C., 2007. Effect of tributyltin on the development of ovary in female cuniv (*Sebastes marmoratus*). *Aquat. Toxicol.* 83 (3), 174–179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.018>. PubMed PMID: WOS:000244827730002.
- Zhang, J., Zuo, Z., Wang, Y., Yu, A., Chen, Y., Wang, C., 2011. Tributyltin chloride results in dorsal curvature in embryo development of *Sebastes marmoratus* via apoptosis pathway. *Chemosphere* 82 (3), 437–442. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.057>.
- Zhang, J., Zuo, Z., Xiong, J., Sun, P., Chen, Y., Wang, C., 2013. Tributyltin exposure causes lipotoxicity responses in the ovaries of rockfish, *Sebastes marmoratus*. *Chemosphere* 90 (3), 1234–1299. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.078>. PubMed PMID: WOS:000312978700053.
- von Engelhardt, N., Carere, C., Dijkstra, C., Groothuis, T.G.G., 2006. Sex-specific effects of yolk testosterone on survival, begging and growth of zebra finches. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273 (1582), 65–70. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2005.3274>. PubMed PMID: WOS:000234648100010.

A.4 No effects of the antiandrogens cyproterone acetate (CPA), flutamide and *p,p'*-DDE on early sexual differentiation but CPA-induced retardation of embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*)

Luzie Jessl, Jörg Oehlmann

Eingereicht in:

PeerJ

Volume: -

Manuskript-Nr.: 86820

Erklärung zu den Autorenteilen an der Publikation: No effects of the antiandrogens cyproterone acetate (CPA), flutamide and *p,p'*-DDE on early sexual differentiation but CPA-induced retardation of embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*)

Status: eingereicht

Name der Zeitschrift: PeerJ (Manuskript-Nr.: 86820)

Beteiligte Autoren: Luzie Jessl (LJ), Jörg Oehlmann (JO)

Was hat die Promovierende bzw. was haben die Co-Autoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierende LJ: 75%

Co-Autor JO: 25%

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierende LJ: 100% (Injektion, Bebrütung, Gonadenisolation, Histologie)

Co-Autor Rest: 0%

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierende LJ: 100% (Aufarbeitung aller Rohdaten, Erstellung von Abbildungen)

Co-Autor JO: 0%

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierende LJ: 95% (Interpretation und Analyse, Publikationsrecherche)

Co-Autor JO: 5% (Interpretation und Analyse)

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierende LJ: 90%

Co-Autor JO: 10%

Important declarations

Please remove this info from manuscript text if it is also present there.

Associated Data

Data supplied by the author:

The raw measurements are available in an Excel-file. The raw data show all measurements for general or gonad-based endpoints of untreated and substance treated embryos.

Required Statements

Competing Interest statement:

Prof. Dr Jörg Oehlmann is an Academic Editor for PeerJ. Luzie Jessl is an employee of R-Biopharm AG.

Funding statement:

This work was carried out in the framework of the project GenOvotox II, funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF; project no 031A104B).

No effects of the antiandrogens cyproterone acetate (CPA), flutamide and *p,p'*-DDE on early sexual differentiation but CPA-induced retardation of embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*)

Luzie Jessl^{Corresp., 1, 2}, Jörg Oehlmann¹

¹ Aquatic Ecotoxicology, Goethe University Frankfurt, Frankfurt am Main, Hesse, Germany

² R-Biopharm AG, Darmstadt, Hesse, Germany

Corresponding Author: Luzie Jessl

Email address: jessl@bio.uni-frankfurt.de

Because a wide range of environmental contaminants are known to cause endocrine disorders in humans and animals, *in vivo* tests are needed to identify such endocrine disrupting chemicals (EDCs) and to assess their biological effects. Despite the lack of a standardized guideline, the avian embryo has been shown to be a promising model system which responds sensitively to EDCs. After previous studies on the effects of estrogenic, antiestrogenic and androgenic substances, the present work focuses on the effects of *in ovo* exposure to *p,p'*-DDE, flutamide and cyproterone acetate (CPA) as antiandrogenic model compounds regarding gonadal sex differentiation and embryonic development of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). The substances were injected into the yolk of fertilized eggs on embryonic day one. On embryonic day 19 sex genotype and phenotype were determined, followed by gross morphological and histological examination of the gonads. Treatment with flutamide (0.5, 5, 50 µg/g egg), *p,p'*-DDE (0.5, 5, 50 µg/g egg) or CPA (0.2, 2, 20 µg/g egg) did not affect male or female gonad development, assessed by gonad surface area and cortex thickness in both sexes and by the percentage of seminiferous tubules in males as endpoints. This leads to the conclusion that antiandrogens do not affect sexual differentiation during embryonic development of *G. gallus domesticus*, reflecting that gonads are not target organs for androgens in birds. *In ovo* exposure to 2 and 20 µg CPA/g egg, however, resulted in significantly smaller embryos as displayed by shortened lengths of skull, ulna and tarsometatarsus. Although gonadal endpoints were not affected by antiandrogens, the embryo of *G. gallus domesticus* is shown to be a suitable test system for the identification of substance-related mortality and developmental delays.

1 **No effects of the antiandrogens cyproterone acetate (CPA), flutamide and *p,p'*-DDE on early**
2 **sexual differentiation but CPA-induced retardation of embryonic development in the**
3 **domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*)**

4

5 **Luzie Jessl ^{1,2*}, Jörg Oehlmann ¹**

6

7 ¹ Goethe University Frankfurt, Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Department Aquatic
8 Ecotoxicology, Max-von-Laue-Str. 13, 60438 Frankfurt am Main, Hesse, Germany

9 ² R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Hesse, Germany

10

11 *Corresponding author

12 jessl@bio.uni-frankfurt.de

13 oehlmann@bio.uni-frankfurt.de

14 **ABSTRACT**

15 Because a wide range of environmental contaminants are known to cause endocrine disorders in
16 humans and animals, *in vivo* tests are needed to identify such endocrine disrupting chemicals
17 (EDCs) and to assess their biological effects. Despite the lack of a standardized guideline, the
18 avian embryo has been shown to be a promising model system which responds sensitively to
19 EDCs. After previous studies on the effects of estrogenic, antiestrogenic and androgenic
20 substances, the present work focuses on the effects of *in ovo* exposure to *p,p'*-DDE, flutamide and
21 cyproterone acetate (CPA) as antiandrogenic model compounds regarding gonadal sex
22 differentiation and embryonic development of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). The
23 substances were injected into the yolk of fertilized eggs on embryonic day one. On embryonic day
24 19 sex genotype and phenotype were determined, followed by gross morphological and
25 histological examination of the gonads. Treatment with flutamide (0.5, 5, 50 µg/g egg), *p,p'*-DDE
26 (0.5, 5, 50 µg/g egg) or CPA (0.2, 2, 20 µg/g egg) did not affect male or female gonad development,
27 assessed by gonad surface area and cortex thickness in both sexes and by the percentage of
28 seminiferous tubules in males as endpoints. This leads to the conclusion that antiandrogens do not
29 affect sexual differentiation during embryonic development of *G. gallus domesticus*, reflecting
30 that gonads are not target organs for androgens in birds. *In ovo* exposure to 2 and 20 µg CPA/g
31 egg, however, resulted in significantly smaller embryos as displayed by shortened lengths of skull,
32 ulna and tarsometatarsus. Although gonadal endpoints were not affected by antiandrogens, the
33 embryo of *G. gallus domesticus* is shown to be a suitable test system for the identification of
34 substance-related mortality and developmental delays.

35 **Key words:** Chicken embryo, endocrine disruption, gonad, developmental toxicant, histology,
36 dwarfism

37 1. INTRODUCTION

38 Among the substances in constant use, there is a group of chemicals with structural similarity to
39 natural sex hormones. Contaminants with hormonal action, so called endocrine disrupting
40 chemicals (EDCs), are suspected to affect the development and health status of humans and
41 animals with special focus on sex differentiation and reproduction. As agonists and antagonists of
42 androgen (AR) and estrogen (ER) receptors, EDCs can activate or block corresponding receptors,
43 potentially affecting all systems controlled by the endocrine system. A growing number of reports
44 underlines the assumption, that EDCs pose a threat to the ecosystem and to animal and human
45 health (*Delbes et al., 2022; Ho et al., 2022; Marlatt et al., 2022; Metcalfe et al., 2022*). In order
46 to assess possible effects and to weigh risks, the testing of chemicals for their endocrine potential
47 is of great importance.

48 Currently, there are several internationally standardized biotests for the testing of androgenic and
49 estrogenic EDCs in mammals, among them two frequently used rodent-based tests, namely
50 Hershberger assay (*OECD, 2009*) and uterotrophic assay (*OECD, 2007*). Since mainly juvenile
51 and adult animals with full pain perception are used in these tests, the search for a suitable animal
52 replacement system is of great significance. Moreover, these tests do not adequately reflect the
53 impact of EDCs on the most sensitive stage of life, the developing embryo.

54 There is a long tradition of using avian embryos to study sexual development and potential effects
55 of environmental pollutants including EDCs (*Berg et al., 1998; Berge et al., 2004; Biau et al.,*
56 *2007; Eising et al., 2001; Fry & Toone, 1981*). It is well known that the exposure of xenobiotics
57 during avian embryonic development can induce irreversible deformities or malformations of the
58 sex organs and disrupt gender-specific behavior (*Farhat et al., 2020; Ottinger et al., 2008; Quinn*
59 *et al., 2008*). One advantage is that the avian egg can be considered as a closed system lacking any

60 exchange with its environment except for the interchange of gases. The single administration of a
61 specific and standardized dose, often injected directly into the egg (*Berg et al., 1999*), may be
62 sufficient to affect the developing embryo (*Davies et al., 1997; Gooding et al., 2003; McAllister*
63 *& Kime, 2003; Zhang et al., 2007*). Since no exchange or loss of the substance is possible, this
64 injection results in chronic chemical exposure.

65 The embryo of domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) is particularly suitable for our
66 experiments as its developmental stages are fully described (*Hamburger & Hamilton, 1992; Keibel*
67 *& Abraham, 1900; Starck & Ricklefs, 1997*).

68 Since there is no standardized procedure available, the present study is part of a project aiming to
69 expedite a protocol to assess the potential effect of EDCs on early sexual differentiation in the
70 chicken embryo. In earlier publications we presented the effect of estrogens, antiestrogens, and
71 androgens on embryonic gonad sex development. In the present study we finally analyzed the
72 effects of antiandrogenic compounds on embryonic development with special focus on potential
73 gross morphological and histological changes of the gonads. Cyproterone acetate (CPA), flutamide
74 and *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE) were chosen as antiandrogenic model
75 compounds.

76 An important class of antiandrogens are synthetic drugs such as CPA and flutamide that were
77 specifically designed to competitively bind to androgen receptors *in vivo* (*Bhatia et al., 2014b*).
78 These AR antagonists have been used to treat androgen-dependent prostate cancer in men and
79 menstrual cycle irregularities in women with polycystic ovarian syndrome (*Heinlein & Chang,*
80 *2004; Paradisi et al., 2013*). Furthermore, both compounds have been used for the testing of
81 potential effects on different non-target organisms including the bird embryo (*Adkinsregan &*
82 *Garcia, 1986; de Gregorio et al., 2021; Fitzgerald et al., 2020; Gismondi et al., 2019; Jin et al.,*

83 2019; Mentessidou *et al.*, 2021; Rangel *et al.*, 2006; Rolon *et al.*, 2019; Utsumi & Yoshimura,
84 2009, 2011; Yu *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021).

85 *P,p'*-DDE is the primary metabolite of the insecticide DDT, which was used widely from the 1940s
86 until its ban in most industrial countries in the 1970s (Quinn *et al.*, 2008). DDT and its metabolites
87 are known to induce eggshell thinning and developmental disorders in fish-eating and raptorial
88 seabirds (Bouwman *et al.*, 2019; Buck *et al.*, 2020; Fry & Toone, 1981; Hickey & Anderson, 1968;
89 Holm *et al.*, 2006; Peakall & Lincer, 1996; Ratcliffe, 1970) and affect sexual development in quail
90 and chicken (Blomqvist *et al.*, 2006; Halldin *et al.*, 2003; Kamata *et al.*, 2020; Quinn *et al.*, 2008).

91 2. MATERIALS AND METHODS

92 2.1 Dosing

93 All experiments were carried out with respect for the principles of laboratory animal care, in
94 accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986
95 (86/609/EEC) and the German Animal Welfare Act.

96 Cyproterone acetate (CPA; CAS: 427-51-0), flutamide (CAS: 13311-84-7) and *p,p'*-
97 dichlordiphenyldichlorethen (*p,p'*-DDE; CAS: 72-55-9) were purchased from Sigma Aldrich
98 Chemie GmbH (München, Germany). Fertilized eggs of white Leghorn (*G. gallus domesticus*)
99 were obtained from a local breeder (LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetrieb, Dieburg,
100 Germany). Eggs were incubated at $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $60 \pm 10\%$ relative humidity and turned over
101 eight times a day in a fully automated incubator (J. Hemel Brutgeräte, Verl, Germany). CPA (0.2,
102 2, 20 $\mu\text{g/g}$ egg), flutamide (0.5, 5, 50 $\mu\text{g/g}$ egg) and *p,p'*-DDE (0.5, 5, 50 $\mu\text{g/g}$ egg) were dissolved
103 in 15 μL (CPA) or 60 μL (*p,p'*-DDE and flutamide) of the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO;
104 CAS: 67-68-5; purity: 99.5%; Applichem, Darmstadt, Germany) and injected into the yolk on day
105 one of incubation via a small hole at the widest diameter of the egg using Hamilton microliter
106 syringes and needles (ga22s/51mm/pst2). Following injection, the shell was sealed with agarose
107 gel (3%, in phosphate buffered saline). During incubation, eggs were periodically checked by
108 candling to identify unfertilized eggs or dead embryos.

109 2.2 Dissection, tissue preparation and evaluation

110 Dissection was performed on day 19 of incubation. All embryos were examined for external
111 deformations and malformations of inner organs with special focus on ovaries and testes. Gonad

112 surface areas were analyzed by determining the entire visible surface of each single gonad with an
113 image editing program (Fiji is just ImageJ, Open Source). Gonads were dissected and fixed in
114 Bouin's solution for 24 hours. The fixative was removed by repeated rinsing with 80% ethanol.
115 Ethanol was removed by saccharose solution (10, 20 and 30% in phosphate buffered saline).
116 Gonads were embedded in Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn,
117 Netherlands) and sectioned (6 µm) by a cryomicrotome (Microm HM 500 O, Thermo Fisher
118 Scientific Germany, Bonn, Germany) at -23°C. Tissue sections were stained with hematoxylin and
119 eosin.

120 **2.3 Determination of sexual genotype**

121 A tissue sample from the heart was used for DNA isolation. Dead embryos, identified and removed
122 before dissection, were also sampled. All embryos were typed for their sexual ZZ or ZW genotype,
123 using the PCR-based method of *Fridolfsson and Ellegren (1999)*. DNA-amplification was
124 performed using qPCR and the primers 2550F “5'-GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA-3'” and
125 2718R “5'-ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG-3'”. Following amplification, all qPCR
126 products underwent a melting curve, which resulted in characteristic bands for each sex. Both
127 sexes had a single 600-bp CHD1-Z specific fragment with a melting temperature of ~84°C.
128 Females had an additional 450-bp CHD1-W females-specific fragment with a melting temperature
129 of ~82°C.

130 **2.4 Determination of embryonic energy metabolism**

131 In order to study the impact of CPA-treatment on embryonic energy metabolism, protein,
132 glycogen, and lipid contents were determined using a tissue sample from the liver taken during
133 dissection. Six embryos of untreated and solvent control group as well as CPA-treated groups were

134 used. The liver was weighted and homogenized with a 2% sodium sulfate solution. Part of the
135 homogenate was used to determine the protein content according to *Bradford (1976)*. Another part
136 of the homogenate was used to determine glycogen and lipid contents according to (*Van Handel,*
137 *1965; Van Handel, 1985a, 1985b*). For each fraction calibration curves using standards in five
138 ascending concentrations were created using 0.1% BSA solution (protein), 0.1% glucose solution
139 (glycogen) or 0.1% rape solution (lipid). Standards were treated analogously to samples. The
140 absorbance of standards and samples was determined using a photometer (BioSpecrometer®,
141 Eppendorf, Hamburg, Germany; protein: 595 nm; glycogen/lipid: 625 nm). The absorbance of the
142 respective standards was plotted against protein, glucose, or lipid content, respectively, calculating
143 linear calibration curves. Based on the respective calibration curve, protein, glycogen, or lipid
144 contents of the samples ($\mu\text{g/g}$ liver) were determined and extrapolated to the total volume of the
145 homogenate. Using the specific calorific values (protein: 17 kJ/g; glucose: 17 kJ/g; lipid: 37 kJ/g)
146 the energy content of protein, glycogen and lipid reserves in J/mg embryo was calculated.

147 **2.5 Measurements and statistics**

148 For histological examination of embryonic gonads, a light microscope (Olympus BX50, Olympus,
149 Tokyo, Japan) and a camera (JVC Digital Camera, KY-F75U, Yokohama, Japan) were used.
150 Cortex thickness (both sexes) and the percentage of seminiferous tubules (males) in left gonads
151 were measured (Fiji is just ImageJ, Open Source). Ten sections per embryo were evaluated,
152 exclusively taken from the gonad's middle sectional plane. Five measurements per section were
153 performed to determine the cortex thickness. Since cortex thickness is not constant over the whole
154 organ, different representative areas around the gonad were chosen. The area of all seminiferous
155 tubules in a defined image section was measured to determine a representative percentage of

156 seminiferous tubules in the male left testis. For this a random representative image section was
157 selected which showed only the medullary tissue but not the cortex region.

158 One experiment was performed with different concentrations of CPA (0.2, 2, 20 $\mu\text{g/g}$ egg), another
159 experiment was performed with different concentrations of flutamide and *p,p'*-DDE (0.5, 5, 50
160 $\mu\text{g/g}$ egg). Solvent control was used as the reference-control. Data were analyzed using Fisher's
161 exact test and one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test with GraphPad Prism
162 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

163 3. RESULTS

164 3.1 Embryonic mortality and malformations

165 *In ovo* exposure to all concentrations of *p,p'*-DDE and flutamide caused a concentration-dependent
166 increase in embryonic mortality which was found to be significantly different from the solvent
167 control for 50 µg *p,p'*-DDE/g egg ($p < 0.05$) and 5 and 50 µg flutamide/g egg ($p < 0.05$ and $p < 0.01$,
168 respectively). Mortality rates of *p,p'*-DDE-treated groups were between 45% and 55%, mortality
169 rates of flutamide-treated groups were between 53% and 70% (see figure 3A).

170 Different types of single or multiple malformations were found in the control-, *p,p'*-DDE or
171 flutamide-treated groups. In the untreated control group one embryo (6.67%) showed celosomia.
172 In the solvent control two embryos (13.3%) showed either malformations of the extremities or
173 celosomia. *In ovo* exposure to 0.5 µg *p,p'*-DDE/g egg led to two malformed embryos (10.5%), one
174 of them with both-sided anophthalmia, the other one a “twin embryo” conjoined at the head,
175 showing various malformations. *In ovo* exposure to 5 µg *p,p'*-DDE/g egg led to one malformed
176 embryo (5.3%) with crossed beak and a cyclops-like eye at the front of the head. *In ovo* exposure
177 to 0.5 µg flutamide/g egg led to two malformed embryos (10.0%) with celosomia, crossed beak
178 and left-sided or both-sided anophthalmia while *in ovo* exposure to 5 µg flutamide/g egg led to
179 one embryo (5.0%) with celosomia. In the highest concentration (50 µg/g egg) of both *p,p'*-DDE
180 and flutamide, no malformations were detected. None of the *p,p'*-DDE- or flutamide-treated
181 groups showed a statistically significant difference from the solvent or the untreated control group.

182 *In ovo* exposure to all concentrations of CPA resulted in a concentration-dependent increase in
183 mortality which was found to be significantly different from the solvent control group for 20 µg
184 CPA/g egg ($p < 0.01$). In the group treated with the highest concentration of CPA (20 µg/g egg),

185 this resulted in nearly 78% mortality leaving only a few embryos for follow-up analyses (see figure
186 1A).

187 Different types of single or multiple malformations were found in the solvent control and CPA-
188 treated groups. In the untreated control group, none of the embryos showed malformations. In the
189 solvent control one embryo (8.3%) showed celosomia. *In ovo* exposure to 0.2 µg CPA/g egg led
190 to one embryo (4.3%) with left-sided anophthalmia and *in ovo* exposure to 2 µg CPA/g egg led to
191 two malformed embryos (8.3%) with exencephalia, right-sided anophthalmia and celosomia. None
192 of the CPA-treated groups showed a statistically significant difference from the solvent or the
193 untreated control group.

194 Remarkably, an increased incidence of significantly delayed development was found, which
195 especially occurred at concentrations of 2 and 20 µg CPA/g egg. In order to analyze this
196 statistically, the parameters length of skull (from the tip of the beak to the back of the head), length
197 of ulna (right side) and length of tarsometatarsus (right side) were measured. Embryos exposed to
198 the lowest concentration of 0.2 µg CPA/g egg showed no effects on body lengths, while higher
199 concentrations of 2 and 20 µg CPA/g egg resulted in a statistically significant reduction of all three
200 parameters ($p < 0.001$, respectively) compared to the solvent control (see figure 2A).

201 To investigate the potential impact of CPA-treatment on embryonic energy reserves, we
202 determined the content of protein, glycogen, and lipid in liver samples of control and CPA-
203 treated groups. Compared to the solvent control, all CPA treatments were characterized by a
204 significantly decreased content of glycogen (0.2 µg CPA/g egg: $p < 0.01$; 2 and 20 µg CPA/g egg:
205 $p > 0.001$, respectively). In addition, embryos exposed to the highest concentration of 20 µg
206 CPA/g egg showed a significantly decreased content of protein ($p < 0.001$). However, the content

207 of lipids in this group was marginally but not statistically significantly increased ($p>0.05$) (see
208 figure 2B).

209 **3.2 Morphological observation of the gonads – gonad surface area**

210 Exposure to higher concentrations of *p,p'*-DDE or all concentrations of flutamide had no
211 statistically significant effect on the surface areas of male or female gonads. Only *in ovo* exposure
212 to 0.5 $\mu\text{g } p,p'$ -DDE/g egg resulted in a statistically significant decrease of the surface area of the
213 right ovary and a statistically significant increase of the surface area of the left testis ($p<0.05$,
214 respectively) compared to the solvent control. In control groups there was a statistically significant
215 difference between the untreated and the solvent control for the female left gonad surface area
216 ($p<0.001$) and left and right male gonad surface areas ($p<0.05$, respectively) (see figure 3B).
217 Compared to the solvent control, *in ovo* exposure to CPA did not affect male or female gonad
218 surface areas (see figure 1B).

219 **3.3 Histological observation of the gonads – left testis and ovary**

220 None of the examined antiandrogenic substances induced any effect on male or female gonadal
221 sex differentiation. Neither *p,p'*-DDE, flutamide or CPA had a statistically significant effect on
222 the percentage of seminiferous tubules in left testes or the cortex thickness in left testes or ovaries
223 at any of the tested concentrations (see figures 1C and 3C). The mean values for these endpoints
224 in the antiandrogen-treated groups varied around the mean value of the respective solvent control
225 group. The high mortality rate in the highest concentration of CPA (20 $\mu\text{g/g}$ egg) resulted in a lack
226 of usable tissue samples for the investigation of the histological parameters mentioned.

227 4. DISCUSSION

228 4.1 Embryonic mortality and malformations

229 *In ovo* exposure to higher concentrations of *p,p'*-DDE, flutamide and CPA resulted in significantly
230 increased mortality rates. Steroid hormone-like drugs including CPA and flutamide are known to
231 potentially induce hepatotoxicity when administered at high doses (*Rojas et al., 2020*). Following
232 administration, reactive metabolites of these drugs are formed, which may lead to hepatitis
233 (*Giorgetti et al., 2017; Kassid et al., 2022*). In humans, various case studies report about
234 hepatotoxicity following treatment with flutamide or CPA (e.g., reviewed by *Giorgetti et al. (2017)*
235 and *Kumar et al. (2021)*). The hepatotoxic effect of antiandrogenic substances is also proven by *in*
236 *vivo* and *in vitro* experiments (*de Gregorio et al., 2021; de Gregorio et al., 2016; Ding et al., 2021;*
237 *Legendre et al., 2014; Leone et al., 2014; Snouber et al., 2013*). Therefore, it is traceable that the
238 tested substances adversely affect embryonic development and result in increased mortality rates
239 when administered in higher doses.

240 Furthermore, *in ovo* exposure to 2 and 20 µg CPA/g egg resulted in significantly smaller embryos
241 as displayed by shortened lengths of skull, ulna and tarsometatarsus. A number of experiments
242 with mammals suggest that antiandrogenic substances can affect bone maturation and elongation
243 resulting in an extension of the growth phase. *Neumann (1982)* and *Neumann and Topert (1986)*
244 state that antiandrogens act in all target organs for androgens and principally affect all functions
245 which are influenced by androgens. Some of these effects, such as the delay of puberty, inhibition
246 of spermatogenesis, the loss of libido or the atrophy of accessory glands, are more sex-specific,
247 while other effects such as delayed bone maturation or the inhibition of body weight development
248 are less sex-specific. Especially under the influence of CPA, a retardation of bone maturation and

249 longitudinal growth is shown in experiments with rodents (*Hertel et al., 1969; Schenck &*
250 *Neumann, 1973*). This coincides with the findings of the present study. Delayed embryonic growth
251 of *G. gallus domesticus* can thus be directly attributed to the treatment with CPA. This suggests
252 that the chick embryo is a suitable test system for the identification of substance-related mortality
253 and developmental delays.

254 Embryonic energy reserves were determined to investigate the impact of CPA treatment on
255 embryonic development. With increasing concentrations of CPA, a significant decrease in the
256 levels of glycogen and protein was observed. However, 20 µg CPA/g egg resulted in a significantly
257 increased content of lipids. As CPA is known to potentially induce hepatotoxicity (*Kumar et al.,*
258 *2021; Leone et al., 2014*) it can be suspected that higher contents of lipids in the liver of embryos
259 of *G. gallus domesticus* are signs of an incipient liver damage. In reverse, lower contents of
260 glycogen could be a result of increased metabolic activity for detoxification.

261 **4.2 Morphological observation of the gonads – gonad surface area and left testis and ovary**

262 *In ovo* exposure to flutamide or CPA did not affect male and female gonad surface areas. *In ovo*
263 exposure to 0.5 µg *p,p'*-DDE/g egg resulted in significantly smaller left male and right female
264 gonad surface areas. However, we assume that these results are due to the small number of embryos
265 analyzed per experimental group.

266 The significant difference in gonad surface area between the untreated and the solvent control as
267 found in the experiment with flutamide and *p,p'*-DDE confirms the previous findings of our project
268 group. In *Jessl et al. (2018a)* we intensively analyzed untreated and solvent control groups and
269 found that treatment with DMSO resulted in reduced gonad surface areas in both sexes. Gonad
270 surface areas of these gonads decreased with increasing volume of the solvent. Although we cannot

271 clarify the cause of this effect, we suspect a growth-inhibiting effect caused by the low basic
272 toxicity of the solvent or a possible endocrine-mediated effect of the solvent (*Jessl et al., 2018a*).

273 Summarized, the present study shows that the antiandrogens flutamide, *p,p'*-DDE and CPA have
274 no effects on the tested endpoint gonad surface area. This raises the question of whether the gonads
275 of *G. gallus domesticus* are target organs for antiandrogenic substances. It is known that in
276 mammals, antiandrogens principally affect all androgen-dependent functions and organ systems.
277 In rats, AR antagonists such as flutamide, *p,p'*-DDE and CPA are known to be potent inhibitors of
278 androgen dependent reproductive organs (*Neri & Peets, 1975*) resulting in reduced anogenital
279 distance (*Fussell et al., 2015; Pallares et al., 2014*), hypospadias (*Sinclair et al., 2017*), atrophy
280 of seminal vesicles (*Pallares et al., 2014*), nipple retention (*Fussell et al., 2015*), delayed onset of
281 puberty and reduced ventral prostate weight in male rats (*Kelce et al., 1995*). In fish, flutamide
282 adversely affects male and female sex differentiation. In females it causes hastened ovarian
283 development with distorted morphology (*Chakrabarty et al., 2012*), a reduction of relative gonads
284 size (*Milsk et al., 2016*) and disturbs female reproduction (*Bhatia et al., 2014b*). In males,
285 flutamide affects secondary sex characteristics (*Milsk et al., 2016*) and testicular growth (*Bhatia*
286 *& Kumar, 2016; Bhatia et al., 2014a; Yin et al., 2017*).

287 Also, in birds antiandrogens are known for their hormonal disruptive potential with DDT and its
288 derivatives as the most popular representatives. Enriched through the food chain, this compound
289 leads to egg shell thinning in seabirds (*Fry & Toone, 1981; Hickey & Anderson, 1968*) and intersex
290 testes and oviducts in gull embryos (*Fry & Toone, 1981*). While many species of raptorial and
291 fish-eating birds are shown to be highly sensitive to DDT-related eggshell thinning, other species
292 such as chicken and quail are almost completely insensitive to this end point (*Peakall & Lincer,*
293 *1996*).

294 Considering gonadal endpoints, antiandrogenic effects may be quite different, depending on the
295 test substance and the species used. *O,p'*-DDT for example adversely affects the gonads of
296 domestic roosters resulting in cloacal defects, deformations of one or both testes and smaller
297 diameters of seminiferous tubules (*Blomqvist et al., 2006*). In quail *o,p'*-DDT leads to a significant
298 reduction of plasma testosterone levels and the area of the cloacal gland while testis weight and
299 diameter of seminiferous tubules were not affected. Ovaries appeared unaffected although the right
300 oviduct was regressed and the left oviduct was shortened (*Halldin et al., 2003*). *Quinn et al. (2008)*
301 report that *p,p'*-DDE has no significant effect on gonadal physiology and morphology in both
302 sexes of quail. Studying the effects of *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDT on avian reproduction no change
303 in the morphology of reproductive organs was found (*Kamata et al., 2013*), which coincides with
304 the results of the present study.

305 (*Wollman & Hamilton, 1968; Wollman & Hamilton, 1967*) for example demonstrate an inhibitory
306 effect of CPA on comb size of chicks explained by the antagonization of androgenic effects.
307 Furthermore, *Utsumi and Yoshimura (2009)* described CPA to have inhibitory effects on the
308 development of cloacal gland structures in quail. Since AR and mRNA are produced in this tissue
309 cloacal glands, these are target organs for androgens. On the contrary, CPA did not cause
310 significant structural differences in quail ovaries and testes. In quail, flutamide-treatment affects
311 male copulatory behavior as demonstrated by reduced TP-activated strutting representing a central
312 nervous system effect of the drug (*Adkinsregan & Garcia, 1986*).

313 The lack of antiandrogenic effects on gonad-based endpoint seems to be related to the avian
314 hormonal system. In birds, sexual differentiation is dependent on estrogen (*Brunstrom et al., 2009;*
315 *Vaillant et al., 2001b*). The presence of estrogen causes the differentiation toward the female sex,
316 whereas the absence of estrogen causes differentiation towards the male sex. In contrast, androgens

317 appear to play a minor role in avian sex differentiation (*Estermann et al., 2021; Groenendijk-*
318 *Huijbers & Van Schaik, 1976*). Furthermore, the selected gonad-based endpoints in embryos of *G.*
319 *gallus domesticus* seem to be insensitive to antiandrogens as they are not target organs/tissues for
320 androgens. However, this does not mean that the endpoints studied are generally useless for the
321 investigation of the effects of potential EDCs on embryonic sexual differentiation. In further
322 investigations we found that especially estrogens but also antiestrogens and androgens can
323 adversely affect embryonic sexual differentiation of *G. gallus domesticus*. In (*Jessl et al., 2018b;*
324 *Jessl et al., 2018a*) we have shown that *in ovo* exposure of chick embryos to EE₂, a synthetic
325 estrogen, resulted in a distinct feminization of genetic males which formed female-like cortex
326 tissue in their left gonads. In addition, EE₂ treatment resulted in a reduction of the percentage of
327 seminiferous tubules. In *Jessl et al. (2018b)* we demonstrated that the antiestrogen tamoxifen
328 affected female embryonic sex differentiation and caused a size reduction of the left ovary and
329 malformations of the ovarian cortex. In *Scheider et al. (2018)* we investigated the effects of the
330 functional androgen tributyltin (TBT) and found it to affect sex differentiation as it led to
331 virilization effects of female embryos which were mainly characterized by a significant reduction
332 of the left cortex.

333 5. OVERALL CONCLUSIONS

334 The focus of the present work was to study the effects of the antiandrogenic compounds CPA,
335 *p,p'*-DDE and flutamide on embryonic gonadal sex differentiation of chicken (*Gallus gallus*
336 *domesticus*). *In ovo* exposure to all three substances had no effects on gonadal endpoints. In
337 contrast to test results with estrogenic, antiestrogenic and androgenic compounds, these endpoints
338 were not affected by antiandrogenic EDCs and are therefore shown no suitable parameters for the
339 detection of chemicals with antiandrogenic properties in chick embryos.

340 However, *in ovo* exposure to CPA resulted in significantly smaller embryos than in control groups
341 as displayed by shortened lengths of skull, ulna and tarsometatarsus. This suggests that the chick
342 embryo is a suitable test system for the identification of substance-related mortality and
343 developmental delays.

344 **6. DECLARATIONS**

345 **6.1 Funding**

346 This work was carried out in the framework of the project GenOvotox II, funded by the Federal
347 Ministry of Education and Research (BMBF; project no 031A104B).

348 **6.2 Acknowledgements**

349 We thank Andrea Dombrowski, Simone Ziebart, Alina Helmes and Katrin Collmar for technical
350 assistance.

351 7. REFERENCES

- 352 Adkinsregan, E., & Garcia, M. (1986): Effect of flutamide (an antiandrogen) and diethylstilbestrol on the reproductive-
353 behavior of Japanese quail. *Physiology & Behavior*, 36(3), 419-425.
- 354 Berg, C., Halldin, K., Brunstrom, B., & Brandt, I. (1998): Methods for studying xenoestrogenic effects in birds.
355 *Toxicology Letters*, 103, 671-676.
- 356 Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, A. K., Brandt, I., & Brunstrom, B. (1999): The avian egg as a test system for
357 endocrine disruptors: Effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Science of*
358 *the Total Environment*, 233(1-3), 57-66.
- 359 Berge, J. A., Brevik, E. M., Bjorge, A., Folsvik, N., Gabrielsen, G. W., & Wolkers, H. (2004): Organotins in marine
360 mammals and seabirds from Norwegian territory. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(2), 108-112.
- 361 Bhatia, H., & Kumar, A. (2016): Does anti-androgen, flutamide cancel out the *in vivo* effects of the androgen,
362 dihydrotestosterone on sexual development in juvenile Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*)?
363 *Aquatic Toxicology*, 170, 72-80.
- 364 Bhatia, H., Kumar, A., Chapman, J. C., & McLaughlin, M. J. (2014b): Effects of short-term exposure to the model
365 anti-androgen, flutamide on reproductive function based endpoints in female Murray rainbowfish
366 (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 109, 143-151.
- 367 Bhatia, H., Kumar, A., Ogino, Y., Du, J., Gregg, A., Chapman, J., McLaughlin, M. J., & Iguchi, T. (2014a): Effects
368 of the commercial antiandrogen flutamide on the biomarkers of reproduction in male murray rainbowfish
369 (*Melanotaenia fluviatilis*) *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(5), 1098-1107.
- 370 Biau, S., Bayle, S., Barbara, P. D., & Roig, B. (2007): The chick embryo: An animal model for detection of the effects
371 of hormonal compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1397-1403.
- 372 Blomqvist, A., Berg, C., Holm, L., Brandt, I., Ridderstrale, Y., & Brunstrom, B. (2006): Defective reproductive organ
373 morphology and function in domestic rooster embryonically exposed to *o,p'*-DDT or ethynylestradiol.
374 *Biology of Reproduction*, 74(3), 481-486.
- 375 Bouwman, H., Yohannes, Y. B., Nakayama, S. M. M., Motohira, K., Ishizuka, M., Humphries, M. S., van der Schyff,
376 V., du Preez, M., Dinkelmann, A., & Ikenaka, Y. (2019): Evidence of impacts from DDT in pelican,
377 cormorant, stork, and egret eggs from KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere*, 225, 647-658.
- 378 Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing
379 the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- 380 Brunstrom, B., Axelsson, J., Mattsson, A., & Halldin, K. (2009): Effects of estrogens on sex differentiation in Japanese
381 quail and chicken. *General and Comparative Endocrinology*, 163(1-2), 97-103.
- 382 Buck, A., Carrillo-Hidalgo, J., Camarero, P. R., & Mateo, R. (2020): Organochlorine pesticides and polychlorinated
383 biphenyls in common kestrel eggs from the Canary Islands: Spatiotemporal variations and effects on eggshell
384 and reproduction. *Chemosphere*, 261.
- 385 Chakrabarty, S., Rajakumar, A., Raghuvver, K., Sridevi, P., Mohanachary, A., Prathibha, Y., Bashyam, L., Dutta-
386 Gupta, A., & Senthilkumaran, B. (2012): Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian
387 growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology &*
388 *Pharmacology*, 155(3), 491-497.
- 389 Davies, I. M., Harding, M. J. C., Bailey, S. K., Shanks, A. M., & Lange, R. (1997): Sublethal effects of tributyltin
390 oxide on the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Marine Ecology Progress Series*, 158, 191-204.
- 391 de Gregorio, L. S., Franco-Belussi, L., Goldberg, J., & De Oliveira, C. (2021): Nonylphenol and cyproterone acetate
392 effects in the liver and gonads of *Lithobates catesbeianus* (Anura) tadpoles and juveniles. *Environmental*
393 *Science and Pollution Research*, 28(44), 62593-62604.
- 394 de Gregorio, L. S., Franco-Belussi, L., Gomes, F. R., & de Oliveira, C. (2016): Flutamide effects on morphology of
395 reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella schneideri*. *Aquatic Toxicology*, 176, 181-189.
- 396 Delbes, G., Blazquez, M., Fernandez, J. I., Grigorova, P., Hales, B. F., Metcalfe, C., Navarro-Martin, L., Parent, L.,
397 Robaire, B., Rwigemera, A., Van der Kraak, G., Wade, M., & Marlatt, V. (2022): Effects of endocrine
398 disrupting chemicals on gonad development: Mechanistic insights from fish and mammals. *Environmental*
399 *Research*, 204.
- 400 Ding, Y. N., Ma, H. H., Xu, Y. S., Yang, F., Li, Y., Shi, F. G., & Lu, Y. F. (2021): Potentiation of flutamide-induced
401 hepatotoxicity in mice by Xian-Ling-Gu-Bao through induction of CYP1A2. *Journal of Ethnopharmacology*,
402 278.

- 403 Eising, C. M., Eikenaar, C., Schwbl, H., & Groothuis, T. G. G. (2001): Maternal androgens in black-headed gull
404 (*Larus ridibundus*) eggs: Consequences for chick development. *Proceedings of the Royal Society B-*
405 *Biological Sciences*, 268(1469), 839-846.
- 406 Estermann, M. A., Major, A. T., & Smith, C. A. (2021): Genetic regulation of avian testis development. *Genes*, 12(9).
- 407 Farhat, A., Crump, D., Bidinosti, L., Boulanger, E., Basu, N., Hecker, M., & Head, J. A. (2020): An early-life stage
408 alternative testing strategy for assessing the impacts of environmental chemicals in birds. *Environmental*
409 *Toxicology and Chemistry*, 39(1), 141-154.
- 410 Fitzgerald, J. A., Trznadel, M., Katsiadaki, I., & Santos, E. M. (2020): Hypoxia modifies the response to flutamide
411 and linuron in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environmental Pollution*, 263.
- 412 Fridolfsson, A. K., & Ellegren, H. (1999): A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds.
413 *Journal of Avian Biology*, 30(1), 116-121.
- 414 Fry, D. M., & Toone, C. K. (1981): DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*, 213(4510), 922-924.
- 415 Fussell, K. C., Schneider, S., Buesen, R., Groeters, S., Strauss, V., Melching-Kollmuss, S., & van Ravenzwaay, B.
416 (2015): Investigations of putative reproductive toxicity of low-dose exposures to flutamide in Wistar rats.
417 *Archives of Toxicology*, 89(12), 2385-2402.
- 418 Giorgetti, R., Di Muzio, M., Giorgetti, A., Girolami, D., Borgia, L., & Tagliabracci, A. (2017): Flutamide-induced
419 hepatotoxicity: Ethical and scientific issues. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*,
420 21, 69-77.
- 421 Gismondi, E., Cauchie, H. M., Cruciani, V., & Joaquim-Justo, C. (2019): Targeted impact of cyproterone acetate on
422 the sexual reproduction of female rotifers. *Ecotoxicology*, 28(6), 643-649.
- 423 Gooding, M. P., Wilson, V. S., Folmar, L. C., Marcovich, D. T., & LeBlanc, G. A. (2003): The biocide tributyltin
424 reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*).
425 *Environmental Health Perspectives*, 111(4), 426-430.
- 426 Groenendijk-Huijbers, M., & Van Schaik, J. (1976): Effects of hemicastration, testis implantation and administration
427 of testosterone propionate on the female embryonic genital tract in various breeds and strains of chickens.
428 *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*, 179-182.
- 429 Halldin, K., Holm, L., Ridderstrale, Y., & Brunstrom, B. (2003): Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix*
430 *japonica*) after *in ovo* exposure to *o,p'*-DDT. *Archives of Toxicology*, 77(2), 116-122.
- 431 Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992): A series of normal stages in the development of the chick-embryo
432 (reprinted from *Journal of Morphology*, Vol. 88, 1951). *Developmental Dynamics*, 195(4), 231-272.
- 433 Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004): Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews*, 25(2), 276-308.
- 434 Hertel, P., Kramer, M., & Neumann, F. (1969): Influence of an antiandrogen (cyproterone acetate) on bone growth
435 and bone maturation in male rats *Arzneimittel-Forschung*, 19(11), 1777-&.
- 436 Hickey, J. J., & Anderson, D. W. (1968): Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating
437 birds. *Science*, 162(3850), 271-273.
- 438 Ho, V., Pelland-St-Pierre, L., Gravel, S., Bouchard, M. F., Verner, M. A., & Labreche, F. (2022): Endocrine disruptors:
439 Challenges and future directions in epidemiologic research. *Environmental Research*, 204.
- 440 Holm, L., Blomqvist, A., Brandt, I., Brunstrom, B., Ridderstrale, Y., & Berg, C. (2006): Embryonic exposure to *o,p'*-
441 DDT causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen.
442 *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(10), 2787-2793.
- 443 Jessl, L., Lenz, R., Massing, F. G., Scheider, J., & Oehlmann, J. (2018b): Effects of estrogens and antiestrogens on
444 gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*).
445 *PeerJ*, 6, e5094-e5094.
- 446 Jessl, L., Scheider, J., & Oehlmann, J. (2018a): The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative
447 for mammalian experiments – Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals.
448 *Chemosphere*, 196, 502-513.
- 449 Jin, S. C., Shao, L., Song, X. P., Xiao, J. H., Ouyang, K., Zhang, K. L., & Yang, J. X. (2019): Fertilization and male
450 fertility in the rotifer *Brachionus calyciflorus* in the presence of three environmental endocrines.
451 *Chemosphere*, 220, 146-154.
- 452 Kamata, R., Shiraishi, F., & Nakamura, K. (2020): Avian eggshell thinning caused by transovarian exposure to *o,p'*-
453 DDT: changes in histology and calcium-binding protein production in the oviduct uterus. *Journal of*
454 *Toxicological Sciences*, 45(3), 131-136.
- 455 Kamata, R., Shiraishi, F., Takahashi, S., Shimizu, A., Nakajima, D., Kageyama, S., Sasaki, T., & Temma, K. (2013):
456 The effect of transovarian exposure to *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE on avian reproduction using Japanese quails.
457 *Journal of Toxicological Sciences*, 38(6), 903-912.

- 458 Kassid, O. M., Odhaib, S. A., & Altemimi, M. T. (2022): Flutamide-induced hepatotoxicity: A case report. *Journal of*
459 *Biological Research-Bollettino Della Societa Italiana Di Biologia Sperimentale*, 95(2).
- 460 Keibel, F., & Abraham, K. (1900): Normentafel zur Entwicklungsgeschichte des Huhnes, *Gallus domesticus*. Jena:
461 Fischer.
- 462 Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kemppainen, J. A., & Wilson, E. M. (1995): Persistent DDT
463 metabolite *p,p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375(6532), 581-585.
- 464 Kumar, P., Reddy, S., Kulkarni, A., Sharma, M., & Rao, P. N. (2021): Cyproterone acetate-induced acute liver failure:
465 A case report and review of the literature. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 11(6), 739-741.
- 466 Legendre, A., Jacques, S., Dumont, F., Cotton, J., Paullier, P., Fleury, M. J., & Leclerc, E. (2014): Investigation of the
467 hepatotoxicity of flutamide: Pro-survival/apoptotic and necrotic switch in primary rat hepatocytes
468 characterized by metabolic and transcriptomic profiles in microfluidic liver biochips. *Toxicology in Vitro*,
469 28(5), 1075-1087.
- 470 Leone, A., Nie, A., Parker, J. B., Sawant, S., Piechta, L. A., Kelley, M. F., Kao, L. M., Proctor, S. J., Verheyen, G.,
471 Johnson, M. D., Lord, P. G., & McMillian, M. K. (2014): Oxidative stress/reactive metabolite gene
472 expression signature in rat liver detects idiosyncratic hepatotoxicants. *Toxicology and Applied*
473 *Pharmacology*, 275(3), 189-197.
- 474 Marlatt, V. L., Bayen, S., Castaneda-Cortes, D., Delbes, G., Grigorova, P., Langlois, V. S., Martyniuk, C. J., Metcalfe,
475 C. D., Parent, L., Rwigemera, A., Thomson, P., & Van der Kraak, G. (2022): Impacts of endocrine disrupting
476 chemicals on reproduction in wildlife and humans. *Environmental Research*, 208.
- 477 McAllister, B. G., & Kime, D. E. (2003): Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor
478 tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic*
479 *Toxicology*, 65(3), 309-316.
- 480 Mentessidou, A., Salakos, C., Chrousos, G., Kanaka-Gantenbein, C., Kostakis, A., & Mirilas, P. (2021): Morphologic
481 alterations of the genital mesentery implicated in testis non-descent in rats prenatally exposed to flutamide.
482 *Andrology*, 9(1), 440-450.
- 483 Metcalfe, C. D., Bayen, S., Desrosiers, M., Munoz, G., Sauve, S., & Yargeau, V. (2022): Methods for the analysis of
484 endocrine disrupting chemicals in selected environmental matrixes. *Environmental Research*, 206.
- 485 Milsik, R., Cavallin, J. E., Durhan, E. J., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Martinovic-Weigelt, D., Mueller,
486 N., Schroeder, A., Villeneuve, D. L., & Ankley, G. T. (2016): A study of temporal effects of the model anti-
487 androgen flutamide on components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in adult fathead minnows.
488 *Aquatic Toxicology*, 180, 164-172.
- 489 Neri, R. O., & Peets, E. A. (1975): Biological aspects of antiandrogens. *Journal of Steroid Biochemistry*, 6(6), 815-
490 819.
- 491 Neumann, F. (1982): Pharmacology and clinical use of antiandrogens - A short review *Irish Journal of Medical*
492 *Science*, 151(3), 61-70.
- 493 Neumann, F., & Topert, M. (1986): Pharmacology of antiandrogens. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular*
494 *Biology*, 25(5B), 885-895.
- 495 OECD. (2007): OECD guideline for the testing of chemicals No. 440. Uterotrophic bioassay in rodents. Paris, France:
496 Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 497 OECD. (2009): OECD guideline for the testing of chemicals No. 441. Hershberger bioassay in rats. Paris, France:
498 Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 499 Ottinger, M. A., Lavoie, E., Thompson, N., Barton, A., Whitehouse, K., Barton, M., Abdelnabi, M., Quinn, M.,
500 Panzica, G., & Viglietti-Panzica, C. (2008): Neuroendocrine and behavioral effects of embryonic exposure
501 to endocrine disrupting chemicals in birds. *Brain Research Reviews*, 57(2), 376-385.
- 502 Pallares, M. E., Adrover, E., Imssen, M., Gonzalez, D., Fabre, B., Mesch, V., Baier, C. J., & Antonelli, M. C. (2014):
503 Maternal administration of flutamide during late gestation affects the brain and reproductive organs
504 development in the rat male offspring. *Neuroscience*, 278, 122-135.
- 505 Paradisi, R., Fabbri, R., Battaglia, C., & Venturoli, S. (2013): Ovulatory effects of flutamide in the polycystic ovary
506 syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 29(4), 391-395.
- 507 Peakall, D. B., & Lincer, J. L. (1996): Do PCBs cause eggshell thinning? *Environmental Pollution*, 91(1), 127-129.
- 508 Quinn, M. J., Summitt, C. L., & Ottinger, M. A. (2008): Consequences of *in ovo* exposure to *p,p'*-DDE on reproductive
509 development and function in Japanese quail. *Hormones and Behavior*, 53(1), 249-253.
- 510 Rangel, P. L., Sharp, P. J., & Gutierrez, C. G. (2006): Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and
511 preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens. *Reproduction*,
512 131(6), 1109-1114.

- 513 Ratcliffe, D. A. (1970): Changes attributable to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some
514 british birds. *Journal of Applied Ecology*, 7(1), 67-+.
- 515 Rojas, P. A., Iglesias, T. G., Barrera, F., Mendez, G. P., Torres, J., & San Francisco, I. F. (2020): Acute liver failure
516 and liver transplantation secondary to flutamide treatment in a prostate cancer patient. *Urology Case Reports*,
517 33, 101370.
- 518 Rolon, S., Huynh, C., Guenther, M., Gardezi, M., Phillips, J., Gehrand, A. L., & Raff, H. (2019): The effects of
519 flutamide on the neonatal rat hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes in response to hypoxia.
520 *Physiological Reports*, 7(24).
- 521 Scheider, J., Afonso-Grunz, F., Jessl, L., Hoffmeier, K., Winter, P., & Oehlmann, J. (2018): Morphological and
522 transcriptomic effects of endocrine modulators on the gonadal differentiation of chicken embryos: The case
523 of tributyltin (TBT). *Toxicology Letters*, 284, 143-151.
- 524 Schenck, B., & Neumann, F. (1973): Influence of sexual hormones on bone maturation and bone growth of female
525 rats. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 23(7), 887-907.
- 526 Sinclair, A. W., Cao, M., Pask, A., Baskin, L., & Cunha, G. R. (2017): Flutamide-induced hypospadias in rats: A
527 critical assessment. *Differentiation*, 94, 37-57.
- 528 Snouber, L. C., Bunescu, A., Naudot, M., Legallais, C., Brochot, C., Dumas, M. E., Elena-Herrmann, B., & Leclerc,
529 E. (2013): Metabolomics-on-a-chip of hepatotoxicity induced by anticancer drug flutamide and its active
530 metabolite hydroxyflutamide using HepG2/C3a microfluidic biochips. *Toxicological Sciences*, 132(1), 8-20.
- 531 Starck, M., & Ricklefs, R. (1997): *Avian growth and development: Evolution within the altricial-precocial spectrum*
532 (Vol. 1). Oxford: Oxford University Press.
- 533 Utsumi, T., & Yoshimura, Y. (2009): Sensitive embryonic endpoints with *in ovo* treatment for detecting androgenic
534 and anti-androgenic effects of chemicals in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Poultry Science*, 88(5), 1052-
535 1059.
- 536 Utsumi, T., & Yoshimura, Y. (2011): Applicability of lectin histochemistry in a test system with *in ovo* treatment for
537 detecting androgenic and antiandrogenic effects of chemicals in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Poultry*
538 *Science*, 90(1), 168-174.
- 539 Vaillant, S., Dorizzi, M., Pieau, C., & Richard-Mercier, N. (2001b): Sex reversal and aromatase in chicken. *Journal*
540 *of Experimental Zoology*, 290(7), 727-740.
- 541 Van Handel, E. (1965): Microseparation of glycogen, sugars, and lipids. *Analytical Biochemistry*, 11(2), 266-271.
- 542 Van Handel, E. (1985a): Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*, 1(3),
543 299-301.
- 544 Van Handel, E. (1985b): Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*, 1(3), 302-304.
- 545 Wollman, A. L., & Hamilton, H. L. (1968): Direct action upon avian target organs by the antiandrogen cyproterone
546 acetate. *Anatomical Record*, 161(1), 99-104.
- 547 Wollman, A. L., & Hamilton, J. B. (1967): Inhibition by an anti-androgen of stimulation provided by four androgenic
548 compounds. *Endocrinology*, 81(6), 1431-1434.
- 549 Yin, P., Li, Y. W., Chen, Q. L., & Liu, Z. H. (2017): Diethylstilbestrol, flutamide and their combination impaired the
550 spermatogenesis of male adult zebrafish through disrupting HPG axis, meiosis and apoptosis. *Aquatic*
551 *Toxicology*, 185, 129-137.
- 552 Yu, H., Wen, K., Zhou, X., Zhang, Y., Yan, Z., Fu, H., Zhu, J., & Zhu, Y. (2020): Role of unfolded protein response
553 in genital malformation/damage of male mice induced by flutamide. *Human & Experimental Toxicology*,
554 39(12), 1690-1699.
- 555 Yu, H. M., Zhou, X. Q., Zhang, Y. J., Wen, K. X., Yan, Z. L., Fu, H., & Zhu, Y. F. (2021): Flutamide induces uterus
556 and ovary damage in the mouse via apoptosis and excessive autophagy of cells following triggering of the
557 unfolded protein response. *Reproduction Fertility and Development*, 33(7), 466-475.
- 558 Zhang, J. L., Zuo, Z. H., Chen, Y. X., Zhao, Y., Hu, S., & Wang, C. G. (2007): Effect of tributyltin on the development
559 of ovary in female cuvier (*Sebastiscus marmoratus*). *Aquatic Toxicology*, 83(3), 174-179.

Figure 1

Effects of *in ovo* exposure to cyproterone acetate (CPA; 0.2, 2, 20 $\mu\text{g/g}$ egg) on embryos of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) on embryonic day 19.

Endpoints shown: mortality (A), left and right gonad surface area (B) and cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of left gonad (C). Statistical analysis by Fisher's exact test (A) and one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test (B, C). NC: untreated control group. Lowercase indicates significant differences compared to the solvent control (SC). Level of significance: b, $p < 0.01$. Skull symbol: high mortality in the group resulted in an absence of usable gonad tissue for measurements.

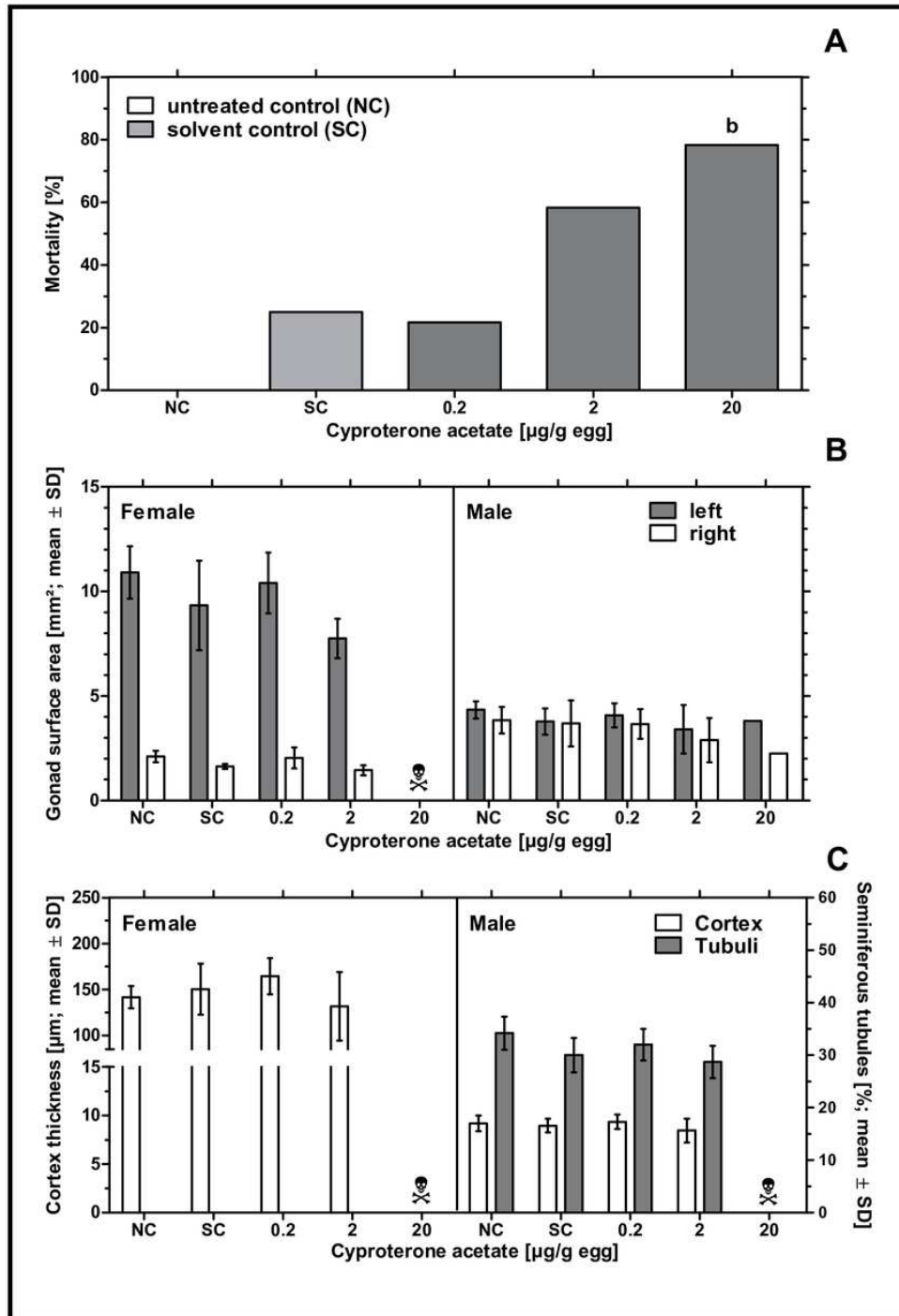


Figure 2

Effects of *in ovo* exposure to cyproterone acetate (CPA; 0.2, 2, 20 $\mu\text{g/g}$ egg) on body lengths and energy levels of embryos of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) on embryonic day 19.

Endpoints shown: length of skull, tarsometatarsus and ulna (A) and energy levels (lipid, protein, and glycogen) of liver (B). Statistical analysis by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. NC: untreated control group. Lowercase indicates significant differences compared to the solvent control (SC). Level of significance: b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$.

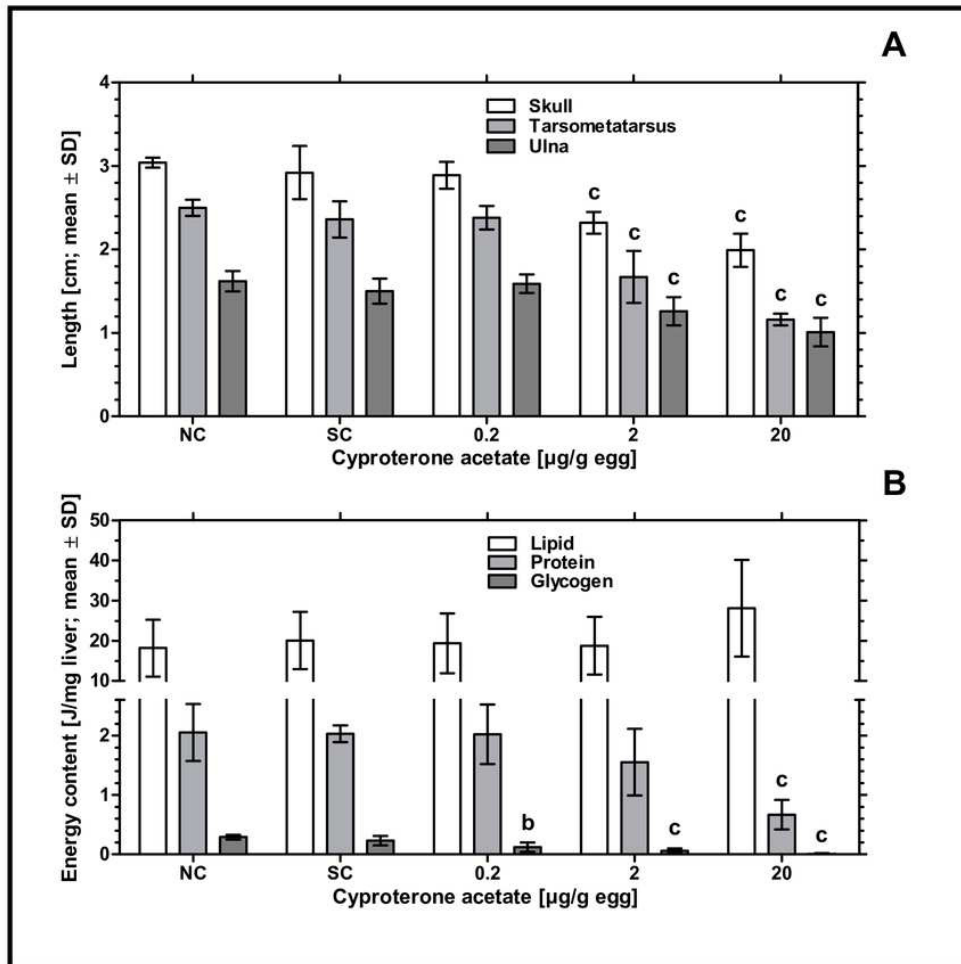
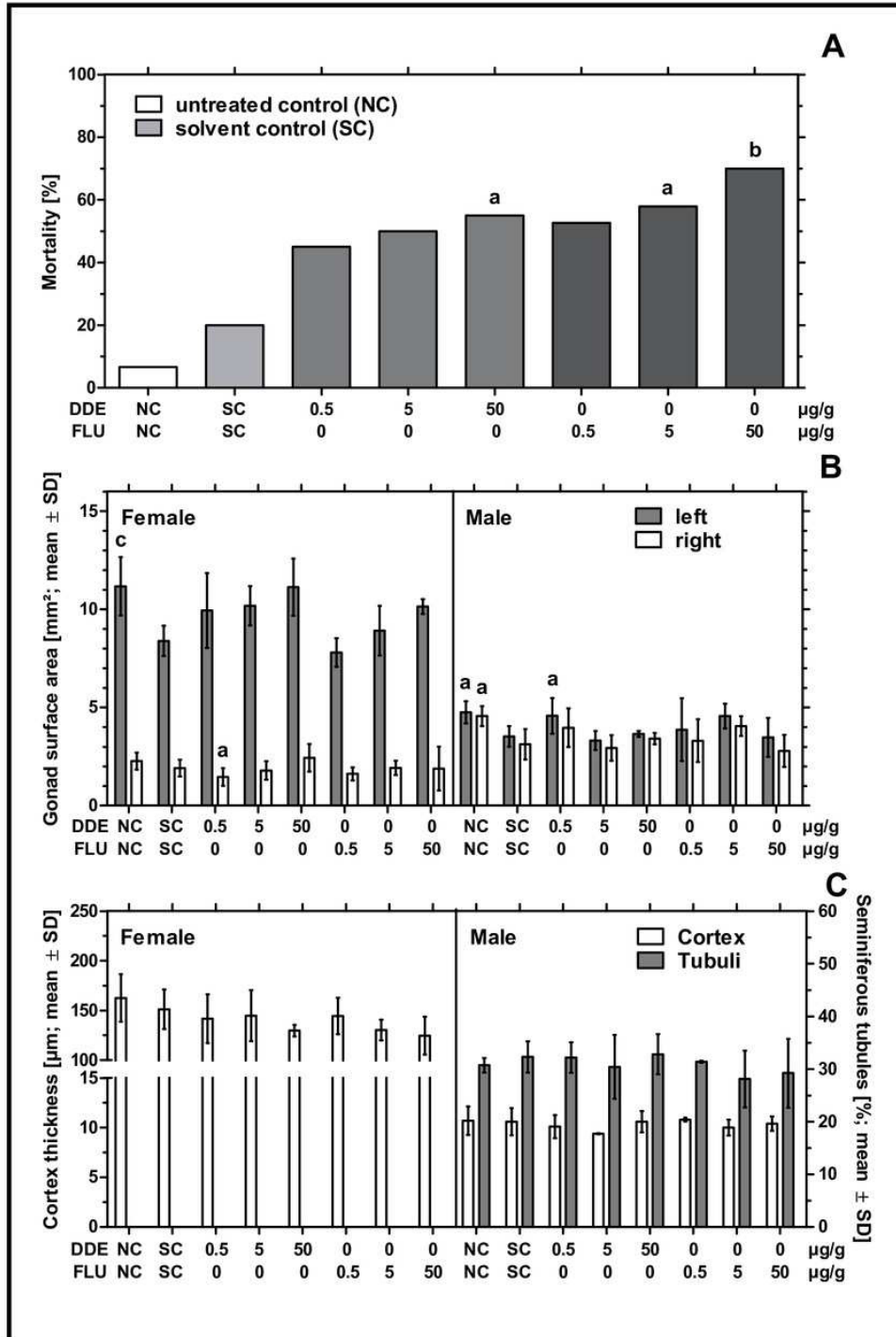


Figure 3

Effects of *in ovo* exposure to *p,p'*-DDE (DDE; 0.5, 5, 50 $\mu\text{g/g}$ egg) and flutamide (FLU; 0.5, 5, 50 $\mu\text{g/g}$ egg) on embryos of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) on embryonic day 19.

Endpoints shown: mortality (A), left and right gonad surface area (B) and cortex thickness and percentage of seminiferous tubules of left gonad (C). Statistical analysis by Fisher's exact test (A) and one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test (B, C). NC: untreated control group. Lowercase indicates significant differences compared to the solvent control (SC). Level of significance: a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$.



A.5 Curriculum vitae

A.6 Publikationsliste und Tagungsbeiträge

PUBLIKATIONEN

L. Jessl, J. Oehlmann (2023): No effects of the antiandrogens CPA, flutamide and *p,p'*-DDE on early sexual differentiation but CPA-induced retardation of embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). PeerJ, eingereicht (Manuskript-ID 86820)

L. Jessl, R. Lenz, F. Massing, J. Scheider, J. Oehlmann (2018): Effects of estrogens and antiestrogens on gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). PeerJ, <https://doi.org/10.7717/peerj.5094>

L. Jessl, J. Scheider, J. Oehlmann (2018): The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for mammalian experiments - Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals. Chemosphere, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.13>

J. Scheider, F. Afonso-Grunz, **L. Jessl**, K. Hoffmeier, P. Winter, J. Oehlmann (2018): Morphologic and transcriptomic effects of endocrine modulators on the gonadal differentiation of chicken embryos: the case of tributyltin (TBT). Toxicology Letters, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.019>

TAGUNGSBEITRÄGE

M. Huisinga, B. Flick, N. Kreling, L. Weltje, K. Ott, **L. Jessl**, Scheider S. Gröters, B. Van Ravenzwaay (2019): A fast screening tool for the early indicator phase of sexual development in birds: Histopathological evaluation of avian gonads from chicks exposed *in ovo* (Poster). Society of Toxicologic Pathology, Raleigh

M. Huisinga, B. Flick, N. Kreling, L. Weltje, K. Ott, **L. Jessl**, J. Scheider S. Gröters, B. Van Ravenzwaay (2017): Histopathological evaluation of gonads from chicks exposed *in ovo* as an alternative method for endocrine endpoints in birds (Poster). Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, Lyon, Frankreich

L. Jessl, R. Lenz, F. Massing, J. Scheider, J. Oehlmann (2015): Investigation of anti-estrogenic substances as disruptors of embryonic gonad development in *Gallus gallus domesticus* (Vortrag und Poster). SETAC Europe Tagung, Barcelona, Spanien

R. Lenz, **L. Jessl**, J. Scheider, J. Oehlmann (2014): Brustkrebsmedikamente beim Haushuhn – Wie wirkt Tamoxifen auf die embryonale Geschlechtsentwicklung? (Poster). SETAC GLB und GDCh Tagung, Gießen/Homberg (Ohm), Deutschland

A.7 Danksagung