

**Stellungnahme der ZKBS**  
**zu einer wissenschaftlichen Veröffentlichung von Séralini *et al.* (2012) zur**  
**Langzeit-Toxizität von NK603 Mais und Roundup GT Plus**

Mit Schreiben vom 02.10.2012 bat das BVL auf Basis eines Erlasses des BMELV die ZKBS um eine Stellungnahme zur Veröffentlichung:

Séralini, G.E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D., de Vendômois, J.S. (2012), Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize, Food Chem. Toxicol.:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.005>.

**1. Zusammenfassende Bewertung**

Die ZKBS vertritt die Auffassung, dass sich aus den in der Studie von Séralini *et al.* (2012) vorgelegten Daten keine begründeten Aussagen über etwaige schädliche Wirkungen durch die Nutzung von Mais mit dem Event NK603 (NK603 Mais) als Lebens- oder Futtermittel oder durch einen möglichen Eintrag von Roundup GT Plus in Trinkwasser ableiten lassen.

Aufgrund eines ungeeigneten Designs, unzureichender Auswertung, lückenhafter Darstellung der Ergebnisse und insbesondere wegen des Fehlens aussagekräftiger statistischer Tests werden die von den Autoren gezogenen Schlussfolgerungen bezüglich der Langzeit-Toxizität von NK603 Mais oder Roundup GT Plus wissenschaftlich nicht belegt.

**2. Gesamtbewertung der Veröffentlichung**

Die Studie weist eine Reihe von gravierenden Mängeln auf. Dazu gehören insbesondere:

- 1) Der verwendete Rattenstamm ist für die hohe Inzidenz an Spontantumoren, insbesondere Brust- und Hypophysentumore, bekannt. Daher ist zu erwarten, dass eine beträchtliche Zahl an Ratten innerhalb eines Zeitraumes von zwei Jahren spontan Tumore entwickelt und stirbt.

Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren feststellen zu können, sollten bei Langzeitstudien und nach international anerkannten Richtlinien (vgl. OECD 451, OECD 453) 50 Tiere pro Geschlecht und pro Dosis verwendet werden. Seralini et al. haben jedoch nur 10 Tiere pro Geschlecht und pro Dosis eingesetzt, eine Tierzahl, die für subchronische (d. h. 90-tägige) Toxizitätsprüfungen vorgesehen ist und mit der man statistisch signifikante Unterschiede in der Sterblichkeit und in der Tumorinzidenz zwischen den Gruppen in einer zweijährigen Fütterungsstudie nicht erkennen kann.

- 2) Bei der Betrachtung der Sterblichkeit und der Tumorinzidenz in den verschiedenen Versuchstiergruppen fällt auf, dass die Autoren weder eine statistische Analyse der Ergebnisse durchgeführt haben, noch eine Dosis-Abhängigkeit beobachten konnten.
- 3) Bei der Analyse der Gewebeveränderungen, die in verschiedenen Organen der behandelten Versuchstiergruppen entstanden, werden „repräsentative“ Bilder gezeigt. Dagegen wird auf eine detaillierte Aufstellung der Befunde verzichtet, so dass man nicht nachvollziehen kann, welche Veränderungen mit welchem Schweregrad wie oft in den verschiedenen Versuchsgruppen auftraten. Darüber hinaus wurde auch in diesem Fall keine statistische Analyse der Daten vorgenommen.
- 4) Bezüglich der gemessenen biochemischen Parameter im Blut und im Urin wurden nach Aussagen der Autoren jeweils 47 Blut- und Harnwerte zu 11 Zeitpunkten bei den männlichen und weiblichen Ratten der 10 Gruppen erhoben. Tatsächlich gezeigt wurden in der Veröffentlichung allerdings nur die Blut- und Urinwerte einer behandelten Versuchstiergruppe zu einem Zeitpunkt und für ein Geschlecht.

Die Ergebnisse der biochemischen Messungen wurden dann einer Diskriminanzanalyse unterzogen. Mit Hilfe dieser Methode wird lediglich festgestellt, welche Parameter am besten geeignet sind, Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen zu erkennen. Allerdings kann man mit der oben genannten Methode nicht bestimmen, ob sich die in den verschiedenen Gruppen gemessenen Parameter statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Somit kann auch kein Zusammenhang zwischen den präsentierten biochemischen Daten und den von den Autoren vermuteten Nierenschäden hergestellt werden.

- 5) Die von den Autoren aufgestellte Hypothese, dass die erhöhte Brusttumorinzidenz bei weiblichen Ratten auf die toxische Wirkung bestimmter Bestandteile aus dem gentechnisch veränderten Mais bzw. des Herbizids „Roundup GT Plus“ auf das Hormonsystem der Tiere zurückzuführen sei, wird anhand der dargestellten Ergebnisse nicht belegt. So wird von den Autoren behauptet, dass die erhöhte Brusttumorinzidenz im Zusammenhang mit Veränderungen im Östradiol-Spiegel der behandelten Tiere steht.

Allerdings sind keine statistisch signifikanten Unterschiede im Östradiol-Spiegel zwischen den unbehandelten und behandelten Ratten zu erkennen.

Nach Ansicht der ZKBS werden die Aussagen bezüglich der gesundheitsschädigenden Wirkungen von gentechnisch verändertem NK603 Mais sowie des Herbizids „Roundup GT Plus“ wissenschaftlich nicht belegt, so dass die vorgestellten Ergebnisse zur Risikobewertung dieses Maisevents nicht herangezogen werden können.

### **3 Begründung**

#### **3.1. Gegenstand der Stellungnahme**

Am 19. September 2012 wurde in der Fachzeitschrift *“Food and Chemical Toxicology”* ein wissenschaftlicher Artikel mit dem Titel *“Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize”* von Séralini *et al.* veröffentlicht. Ziel der Studie war, mögliche durch die Verfütterung von gentechnisch verändertem Glyphosat-toleranten NK603 Mais sowie durch die Verabreichung des Herbizids Roundup GT Plus im Trinkwasser hervorgerufene toxische Effekte in einer zweijährigen Rattenfütterungsstudie zu untersuchen.

Insgesamt wurden in der Fütterungsstudie 200 Ratten, aufgeteilt in 10 Gruppen mit jeweils 10 weiblichen und 10 männlichen Tieren, untersucht. Dabei wurde eine Kontrollgruppe (d.h. insgesamt 20 Tiere) mit neun Testgruppen (d.h. insgesamt 180 Tiere) verglichen, welchen entweder NK603 Mais („GMO“) oder Roundup-behandelter NK603 Mais („GMO+R“) im Futter bzw. Roundup-GT Plus im Trinkwasser verabreicht wurden. Jede Behandlung wurde in drei Konzentrationsstufen durchgeführt (11%, 22%, 33% GMO bzw. 11%, 22%, 33% GMO+R oder 50 ng/l, 400 mg/l, 2,25 g/l Roundup GT Plus Trinkwasser).

Verwendet wurden Sprague-Dawley Albinoratten, die im Alter von fünf Wochen bezogen wurden. Nach ca. 3 Wochen Akklimatisation erfolgte eine Verfütterung der Kontroll- und Testdiäten für 730 Tage (= Versuchsende). Futter und Wasser wurden *ad libitum* verabreicht.

Zusammenfassend sind die Autoren zu dem Ergebnis gelangt, dass Tiere der Behandlungsgruppen "früher und häufiger als die Kontrolltiere sterben" und "mehr sowie früher Tumore entwickeln". Die Autoren der Studie vermuten, dass die von Ihnen erzielten Ergebnisse auf hormonelle Störungen durch das Herbizid Roundup sowie auf die Überexpression des in den Mais eingebrachten Gens und eine damit verbundene Störung der physiologischen Stoffwechselprozesse in den Pflanzen zurückzuführen sei.

#### **3.2. Ermittelte Daten**

### 3.2.1. Versuchsdesign

Es wurde ein Versuchsdesign (angelehnt an der OECD Guideline 453) gewählt, das zur Prüfung der chronischen Toxizität von Stoffen entwickelt worden ist. Die Dauer einer solchen chronischen Toxizitätsprüfung ist in dieser Guideline auf 12 Monate beschränkt, und es werden dabei jeweils 10 weibliche und 10 männliche Tiere pro zu prüfende Dosis eingesetzt.

### 3.2.2. Mortalität

Die Überlebenszeiten aller Tiere wurden bis zum Ende des Versuchs nach 730 Tagen bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle verbliebenen Tiere eingeschläfert. Die Sterblichkeitsdaten werden in der Abb. 1 der Veröffentlichung dargestellt. Dagegen wird nicht gezeigt, ob statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Überlebenszeiten zwischen den Gruppen bestehen.

### 3.2.3. Tumorinzidenz

Laut Publikation wurden die Tiere während des Versuchs zweimal wöchentlich untersucht und tastbare Tumore registriert und vermessen. Die Anzahl der Tumore wurde kumulativ je Behandlungsgruppe in einer Grafik (Abb. 2) dargestellt. In Tabelle 2 der Veröffentlichung wird die Häufigkeit des Auftretens von Tumoren und weiteren Schäden in bestimmten Organen in willkürlich erscheinender Auswahl dargestellt. Eine statistische Analyse der Daten auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wird auch in diesem Fall in der Publikation nicht präsentiert.

### 3.2.4. Histopathologische Beobachtungen

Am Ende des Versuchs bzw. beim vorzeitigen Einschläfern von erkrankten Tieren wurden 37 Organe oder Gewebe für weitere Analysen entnommen. Mindestens 10 Organe wurden gewogen. Von einem Teil der entnommenen Organe wurden Paraffinschnitte gefertigt, die einer Hämatoxylin-Eosin-Safran-Färbung unterzogen wurden. Von Leber, Nieren und Tumoren wurden Schnitte für die Transmissionselektronenmikroskopie gefertigt. In der Publikation wird jedoch nur ein begrenzter Teil dieser Daten in Form von ausgewählten Bildern bzw. Ergebnissen präsentiert.

### 3.2.5. Biochemische Analysen

Nach Angaben der Autoren wurden zu 11 Zeitpunkten Blutproben aus der Schwanzvene sowie Urinproben aller Tiere der 10 Behandlungsgruppen entnommen. Mit

Standardmethoden wurden insgesamt 47 biochemische Parameter in diesen Proben untersucht. In Leberproben, die am Ende des Versuchs genommen wurden, wurden nach Angaben der Autoren verschiedene Enzymaktivitäten bestimmt. Tatsächlich präsentiert werden in der Publikation jedoch nur Ergebnisse der weiblichen Tiere einer Behandlungsgruppe (33% GMO) nach 15 Monaten Versuchsdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies stellt eine sehr begrenzte, willkürliche Auswahl (ca. 1%) der Befunde dar. Zudem werden weder Rohdaten noch Mittelwerte, Extremwerte und Standardabweichungen der gemessenen Parameter dargestellt.

Die Ergebnisse der biochemischen Messungen wurden einer Diskriminanzanalyse unterzogen. Mit Hilfe dieser Methode wird lediglich festgestellt, welche Parameter am besten geeignet sind, Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen zu erkennen. Allerdings kann man mit der oben genannten Methode nicht bestimmen, ob sich die verschiedenen Gruppen in den gemessenen Parameter statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Somit kann auch kein Zusammenhang zwischen den präsentierten biochemischen Daten und den beobachteten Organschäden hergestellt werden.

Ergebnisse zu den genannten Enzymtests in den Leberproben fehlen vollständig.

### 3.3. Bewertung des Versuchsdesigns, der dargestellten Ergebnisse und der zugrundeliegenden Mechanismen

#### 3.3.1. Versuchsdesign

Als erstes muss darauf hingewiesen werden, dass die durchschnittliche Lebenserwartung von Ratten zwei Jahre beträgt und dass der verwendete Rattenstamm für die hohe Inzidenz an Spontantumoren, insbesondere Brust- und Hypophysentumore, bekannt ist. Daher ist zu erwarten, dass eine beträchtliche Zahl an Ratten innerhalb eines Zeitraumes von zwei Jahren spontan erkrankt und stirbt. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren feststellen zu können, sollten bei Langzeitstudien zur Kanzerogenität nach international anerkannten Richtlinien (vgl. OECD 451, OECD 453) 50 Tiere pro Geschlecht und pro Dosis verwendet werden. Seralini et al. haben jedoch nur 10 Tiere pro Geschlecht und pro Dosis eingesetzt, eine Tierzahl, die für subchronische (d. h. 90-tägige) und chronische (d.h. 12 monatige) Toxizitätsprüfungen vorgesehen ist und mit der man statistisch signifikante Unterschiede in der Sterblichkeit und in der Tumorzinzidenz zwischen den Gruppen in einer zweijährigen Fütterungsstudie nicht erkennen kann.

#### 3.3.2. Mortalität

Bei der Betrachtung der Sterblichkeit in den verschiedenen Versuchstiergruppen fällt auf, dass die Autoren weder eine statistische Analyse der Ergebnisse durchgeführt haben, noch eine Dosis-Abhängigkeit der Mortalität festgestellt haben. Da der Versuch obendrein die gesamte Lebenszeit der untersuchten Ratten umfasste, wäre eine höhere Fallzahl für einen zuverlässigen Nachweis unterschiedlicher Überlebenshäufigkeiten notwendig gewesen (s. 3.3.1.).

Wegen fehlender Unterschiede zwischen den Gruppen können keine Rückschlüsse auf einen Einfluss der Verfütterung von NK603 Mais oder Roundup GT Plus im Trinkwasser auf die Überlebensdauer von Ratten gezogen werden. Diesbezügliche Schlussfolgerungen der Autoren sind deshalb nicht gerechtfertigt und aus wissenschaftlicher Sicht unzulässig.

### 3.3.3. Tumorinzidenz

Das Studiendesign wurde nach Angaben der Autoren nicht im Hinblick auf die Untersuchung von Kanzerogenität hin entwickelt. Die Anzahl der Versuchstiere je Behandlungsgruppe war zu gering gewählt, um verlässliche Aussagen zu möglichen Einflüssen der Fütterung auf die Tumorinzidenz zu erlauben. Obwohl diese Tatsache den Autoren offenbar bekannt war, wurden dennoch Schlussfolgerungen im Hinblick auf einen möglichen Einfluss der Fütterung auf die Tumorfrequenz gezogen. Diese Vorgehensweise ist aus wissenschaftlicher Sicht nicht akzeptabel.

Bei der Betrachtung der Tumorinzidenzen in den verschiedenen Versuchstiergruppen fällt auf, dass die Autoren weder eine statistische Analyse der Ergebnisse durchgeführt haben, noch eine Dosis-Abhängigkeit bei den Tumorinzidenzen beobachten konnten. Aufgrund der geringen Gruppengröße und der hohen Inzidenz an Spontantumoren im ausgewählten Rattenstamm ist dies auch nicht zu erwarten.

Die Häufigkeit sowie die Art der beschriebenen Tumore in den Versuchstieren entsprechen der Häufigkeit und der Art der Tumore, die in der Vergangenheit mehrfach für unbehandelte Sprague-Dawley Ratten beschrieben wurden (Suzuki *et al.*, 1979; Nakazawa *et al.*, 2001; Tennekes *et al.*, 2004; Brix *et al.*, 2005; Dinse *et al.*, 2010, Kuzutani *et al.* 2012). Hinweise auf einen möglichen Einfluss der Fütterung lassen sich demnach weder aus Art noch aus der Häufigkeit an Tumoren in den behandelten Versuchstieren ableiten.

Es ist festzustellen, dass aufgrund eines ungeeigneten Versuchsdesigns, einer ungeeigneten Auswertung und einer unvollständigen Darstellung der Ergebnisse keine Aussage zur Erhöhung der Tumorfrequenz als Folge der Behandlung der Tiere ableitbar ist.

Entsprechende Schlussfolgerungen der Autoren sind aus wissenschaftlicher Sicht nicht gerechtfertigt.

#### 3.3.4. Histopathologische Beobachtungen

Es werden exemplarisch eine sehr begrenzte Zahl an Bildern gezeigt; auf eine vollständige Dokumentation und eine quantitative Darstellung der Befunde wird verzichtet. Inwieweit die einzelnen gezeigten Daten repräsentativ für die jeweilige Behandlungsgruppe sind, kann aus den vorgestellten Ergebnissen nicht nachvollzogen werden. Die pathologischen Befunde werden in Tabelle 2 nur grob angegeben und zudem selektiv aufgelistet. Eine klar differenzierte Darstellung nach Organ, Effekt bzw. differentialdiagnostischer Charakterisierung und Schweregrad erfolgt nicht.

Eine wissenschaftlich fundierte Bewertung dieser Beobachtungen ist auf der Grundlage der präsentierten Bilder und Ergebnisse nicht möglich. Zutreffende Schlussfolgerungen bezüglich eines möglichen Einflusses der Fütterung auf histopathologische Parameter können daher nicht gezogen werden.

#### 3.3.5. Biochemische Analysen

Der laut Veröffentlichung sehr umfangreiche erhobene Datensatz wäre geeignet, Rückschlüsse auf mögliche toxische Effekte der verschiedenen Behandlungen zu ziehen. Die Autoren betrachten jedoch nur einen sehr geringen Teil dieser Daten. Dabei kommen sie zu dem Schluss, dass bestimmte biochemische Parameter, insbesondere solche, die im Zusammenhang mit der Natrium- und Chlorid-Ausscheidung stehen, geeignet sein könnten, in einer Diskriminanzanalyse zwischen den beiden ausgewählten Behandlungsgruppen zu unterscheiden (Abb. 5A). Ein hypothesenbasierter statistischer Test zur Feststellung, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der in der Diskriminanzanalyse identifizierten Parametern bestehen, wurde von den Autoren nicht durchgeführt.

Die in Abb. 5B dargestellten Messwerte zur Natrium- und Chlorid-Konzentration im Serum und Urin weisen jedoch darauf hin, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht, da nahezu alle Werte innerhalb eines Intervalls von  $\pm 2$  Standardabweichungen um den Mittelwert liegen. Selbst in diesem selektierten Datensatz gelingt es den Autoren nicht, nachvollziehbar Einflüsse der Fütterung von NK603 Mais oder von Roundup GT Plus im Trinkwasser auf biochemische Parameter zu belegen.

Es ist festzustellen, dass aufgrund der mangelhaften und selektiven Präsentation der Ergebnisse sowie der unzureichenden statistischen Auswertung der Daten eine fundierte wissenschaftliche Bewertung dieses Teils der Studie nicht möglich ist. Die Schlussfolgerungen der Autoren in Bezug auf eine mögliche Schädigung der Nieren oder

des endokrinen Systems durch NK603 Mais bzw. durch Roundup GT Plus sind daher aus wissenschaftlicher Sicht nicht gerechtfertigt.

### 3.3.6. Zugrundeliegende Mechanismen

Die von den Autoren aufgestellte Hypothese, dass die erhöhte Brusttumorinzidenz bei weiblichen Ratten auf die toxische Wirkung bestimmter Bestandteile aus dem gentechnisch veränderten Mais bzw. des Herbizids Roundup GT Plus auf das Hormonsystem der Tiere zurückzuführen sei, wird anhand der dargestellten Ergebnisse nicht belegt. So wird von den Autoren behauptet, dass die erhöhte Brusttumorinzidenz im Zusammenhang mit Veränderungen im Östradiol-Spiegel der behandelten Tiere steht. Allerdings sind keine statistisch signifikanten Unterschiede im Östradiol-Spiegel zwischen den unbehandelten und behandelten Ratten zu erkennen.

- Brix, A. E., Nyska, A., Haseman, J. K., Sells, D. M., Jokinen, M. P., and Walker, N. J. (2005) Incidences of Selected Lesions in Control Female Harlan Sprague–Dawley Rats from Two-Year Studies Performed by the National Toxicology Program. *Toxicol. Pathol.* **33**: 477-483.
- Dinse, G. E., Peddada, S. D., Harris, S. F., and Elmore, S. A. (2010) Comparison of NTP Historical Control Tumor Incidence Rates in Female Harlan Sprague Dawley and Fischer 344/N Rats. *Toxicol. Pathol.* **38**: 765-775.
- Kuzutani, K., Shibunushi, T., Kangawa, Y., and Kihara, T. (2012) Spontaneous Mammary Adenocarcinoma in a Twelve-week-old Female Sprague-Dawley Rat. *J. Toxicol. Pathol.* **25**: 221–224.
- Nakazawa, M., Tawaratani, T., Uchimoto, H., Kawaminami, A., Ueda, M., Ueda, A., Shinoda, Y., Iwakura, K., Kura, K., and Sumi, N. (2001) Spontaneous Neoplastic Lesions in Aged Sprague-Dawley Rats. *Exp. Anim.* **50**: 99-103.
- Tennekes, H., Gemhardt, C., Dammann, M., and van Ravenzwaay, B. (2004) The stability of historical control data for common neoplasms in laboratory rats: adrenal gland (medulla), mammary gland, liver, endocrine pancreas, and pituitary gland. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **40**: 18-27.
- Suzuki, H., Mohr, U., and Kimmerle, G. (1979) Spontaneous Endocrine Tumors in Sprague-Dawley Rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **95**: 187-196.