

# Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)

Harlan Laboratories

Dr. Albrecht Poth

März 2014

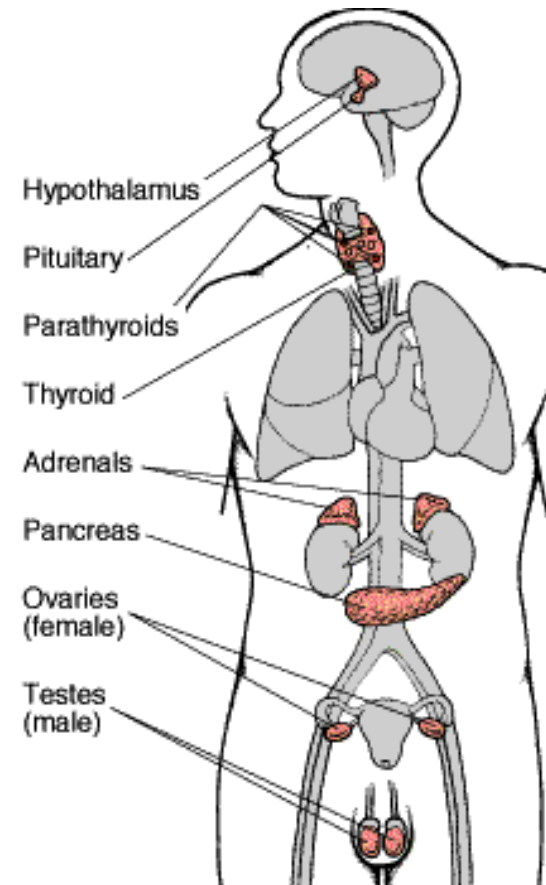
## Endokrine Disruptoren - Definitionen

---

- Weybridge (1996): *“An endocrine disrupter is an exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, secondary (consequent) to changes in endocrine function. A potential endocrine disrupter is a substance that possesses properties that might be expected to lead to endocrine disruption in an intact organism”*.
- European Commission: *“Endocrine disrupters are exogenous substances that alter function(s) of the endocrine system and consequently cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations”*<sup>1</sup>.
- International Programme for Chemical Safety (IPCS): *“Endocrine disrupters have been defined as exogenous substances that alter function(s) of the endocrine system and consequently cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations”*.
- US EPA programme on endocrine disrupters: *“An exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body which are responsible for the maintenance or homeostasis, reproduction, development and or behavior”* (Kavlock et al, 1996).
- Japan (Ministry of Environment): *“Injury and/or hazardous effects on organisms caused by exogenous substances through influence on the endocrine system”*.

# Endokrine Systeme und Hormone

- Endokrine Systeme finden sich in den meisten Tieren, Säugern, Fischen, Amphibien und Reptilien aber auch bei Invertebraten, wie Schnecken oder Insekten
- Das endokrine System besteht aus einer Reihe von Drüsen, wie zum Beispiel die Schilddrüse, die Gonaden, und Nebennieren und den, durch diese produzierten Hormonen wie Thyroxin, Estrogen, Testosteron und Adrenalin welche bei der Entwicklung, des Wachstums, der Reproduktion und des Verhaltens von Tieren und vom Menschen eine entscheidende Rolle spielen
- Hormone gelten als Signalmoleküle, die über das Blut transportiert werden, um an anderen Stellen des Körpers Reaktionen auszulösen.



## Wie wird das endokrine System gestört ?

---

Endokrine Disruptoren greifen in das endokrine System auf mindestens drei unterschiedlichen Wegen ein:

- **Nachahmung von Hormonen** – Nachahmen von natürlichen Hormonen mit der damit verbundenen Induktion gleichartiger chemischer Reaktionen im Körper
- **Hormon-Rezeptor Blockierung** – Blockierung des Hormonrezeptors in den Zellen und damit das Verhindern der Aktion des normalen Hormons
- **Konzentrationsänderung des Hormons** – Angriff in die Synthese, den Transport, den Metabolismus und der Exkretion von natürlichen Hormonen

## EDSP – Geschichte und Hintergründe

---

- Evidenz, dass das endokrine System von Fischen und Wildtieren durch Chemikalien beeinflusst werden kann
- Vielzahl von Chemikalien, die in Laboruntersuchungen in Tieren Effekte am endokrinen System hervorrufen
- Publikation des “Food Quality Protection Act” in 1996, durch den US-Kongress, der von der EPA fordert ein Screening-Programm zu entwickeln um das endokrine-verändernde Potential von Chemikalien festzustellen. Das Resultat war das EDSP, welches entwickelt wurde, um Effekte von Agrochemikalien und Umweltschadstoffen auf das endokrine System des Menschen und von Wildtieren festzustellen
- Von Oktober 2009 bis Februar 2010: EPA publizierte eine Liste von 52 Agro-Wirkstoffen, die auf ihr endokrines Potential geprüft werden sollen

## Umfang des EDSP (1)

---

EDSP fokkusiert auf die Östrogen-, Androgen- und Thyroid-Hormone

**Östrogene** sind eine Gruppe von Hormonen (z.Bsp. Östriol, Östradiol, Östron), die für die weibliche Sexualentwicklung verantwortlich sind. Diese werden primär in den Ovarien produziert

**Androgene** (z.Bsp. Testosteron) sind verantwortlich für die männlichen sexuellen Charakteristiken. Diese werden primär in den Hoden gebildet

**Schilddrüsenhormone** – Schilddrüse sekretiert zwei Haupthormone in die Blutbahn, das Thyroxin und Trijodthyronin. Diese Hormone kontrollieren verschiedene wichtige Prozesse wie das Wachstum, die Entwicklung und den Metabolismus

## Umfang des EDSP (2)

---

- Priorisierung von Chemikalien (Agrochemikalien, HPV Chemikalien)
- 2-Stufen Ansatz

### Stufe 1

*In vitro und in vivo “screens” -*

Feststellung des Potentials mit dem endokrinen System zu interagieren  
**Gefährdungsidentifizierung**

### Stufe 2

*Multi-Generations-Studien -*

Bestätigung, Charakterisierung und Quantifizierung dieser endokrin-bezogenen Effekte: **Risikobewertung**

## EDSP Stufe 1 Prüfungen – *in vitro*

---

- Estrogen receptor binding assay OPPTS 890.1250
- Androgen receptor binding assay OPPTS 890.1150
- Estrogen transcriptional activation assay OPPTS 890.1300  
OECD 455
- Steroidogenesis cell-based H295R assay OPPTS 890.1550  
OECD 456
- Aromatase assay OPPTS 890.1200



## EDSP Stufe 1 Prüfungen – *in vivo*

---

- Fish short-term reproduction assay      OPPTS 890.1350  
OECD 229
- Amphibian metamorphosis assay      OPPTS 890.1100  
OECD 231
- Hershberger assay      OPPTS 890.1400  
OECD 441
- Uterotrophic assay      OPPTS 890.1600  
OECD 440
- Male pubertal assay      OPPTS 890.1500
- Female pubertal assay      OPPTS 890.1450

## EDSP Stufe 1 – Generelle Beobachtungen aus CRO Sicht

---

- Veröffentlichte OPPTS Richtlinien beinhalten eine detaillierte technische Beschreibung des Prüfdesigns und der Durchführung
- Unklarheit der Akzeptanz von Abweichungen zur beschriebenen Versuchsdurchführung
- Dadurch kann es ein, dass etablierte Versuchsverfahren in verschiedenen Laboratorien komplett revidiert bzw. Anpassungen als kritisch angesehen werden müssen
- Zusätzliche Manpower bzw. Kapazitäten sind notwendig, um die technischen Verfahren, Studienpläne, Validierungsstudien, Bewertungsbögen, Berichte und SOP´s aufzubauen
- Bei manchen Verfahren mußten neue analytische Methoden aufgebaut werden
- Die Notwendigkeit zur Durchführung von Nager-Tests kann zu einem Konflikt mit den EU-Tierschutzbestimmungen führen

## Der lange Weg von der ersten Erfahrung...

---

**Rezeptor-Bindungs-Tests** - Chemikalien können das endokrine System durch die Bindung an Hormonrezeptoren beeinträchtigen: Bindung an die Rezeptoren bzw. das Nachahmen der Wirkung der natürlichen Hormone oder durch Blockierung des Zugangs des Hormons zum Rezeptor. Der Androgenrezeptor ist in die Entwicklung der männlichen Sexualcharakteristika involviert, während der Östrogenrezeptor in den weiblichen Reifeprozess und die Fortpflanzungsfunktionen involviert ist. Zwei Rezeptor-Bindungs-Tests sind im EDSP inkludiert:

- **AR-Bindungs-Test** – verwendet das Zytosol der Prostata von Ratten, um die Fähigkeit von Chemikalien zu untersuchen an den Androgenrezeptor zu binden
- **ER-Bindungs-Test** – verwendet das Zytosol des Uterus von Ratten um die Bindung an den Östrogenrezeptor zu untersuchen

## Der lange Weg von der ersten Erfahrung....

---

### Östrogen/Androgen-Rezeptor Bindungstest

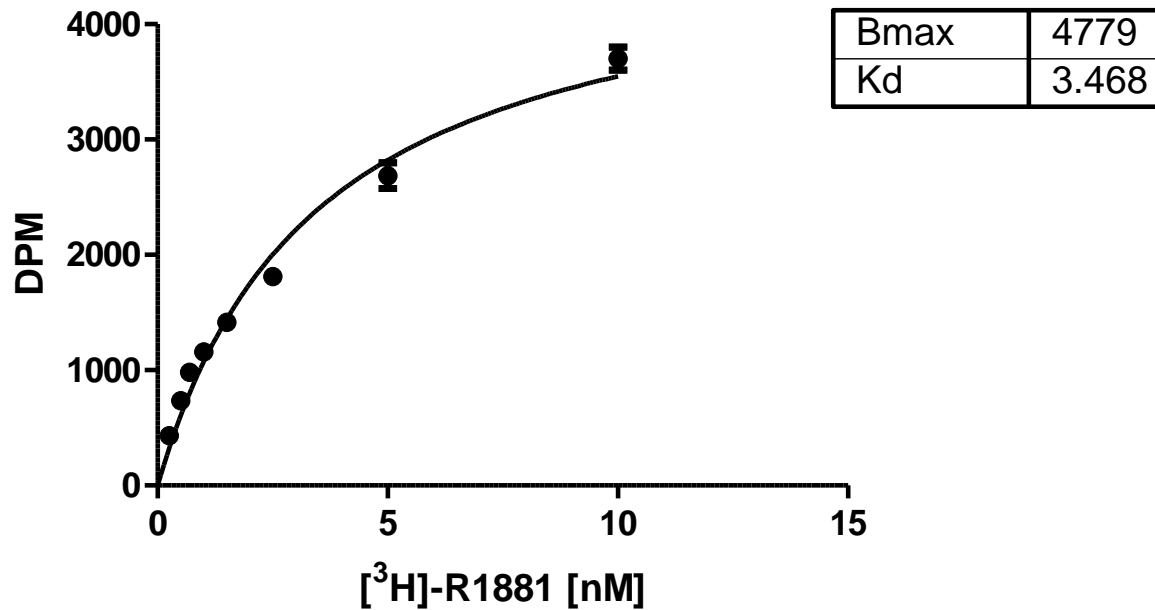
Richtlinie diktiert die Verwendung von Uteri von ovariectomierten Ratten bzw. die Prostata von kastrierten Ratten als Quelle für die Rezeptoren

- Neue Tierschutzerlaubnis war notwendig diese Isolationen durchzuführen und die Tiere zu manipulieren
- Nicht wirklich in vitro, mehr als ex vivo anzusehen
- Viele Kontrollen werden benötigt für jeden Test und drei unabhängige Experimente sind notwendig
- Basierend darauf wird eine Vielzahl von Tieren benötigt, um eine Prüfchemikalie zu untersuchen
- Für den Androgen-Rezeptor-Bindungs Test war das vorgeschriebene Substrat (unmarkiert) erst seit März 2011 in Europa erhältlich

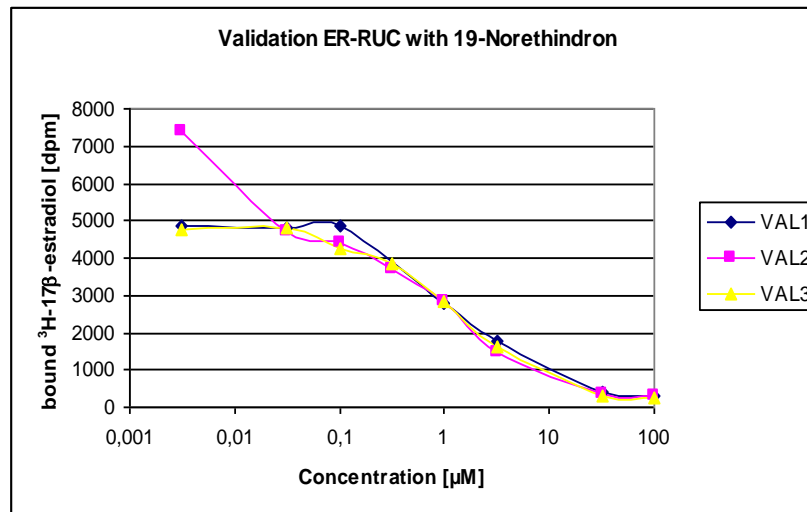
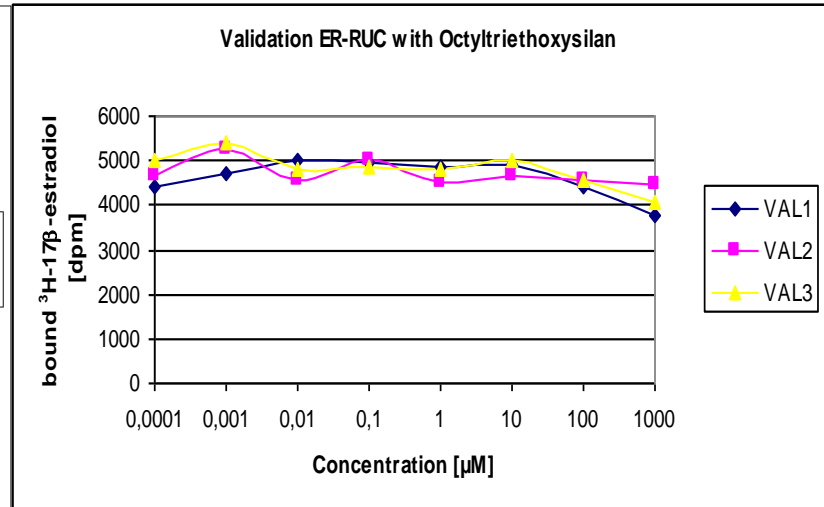
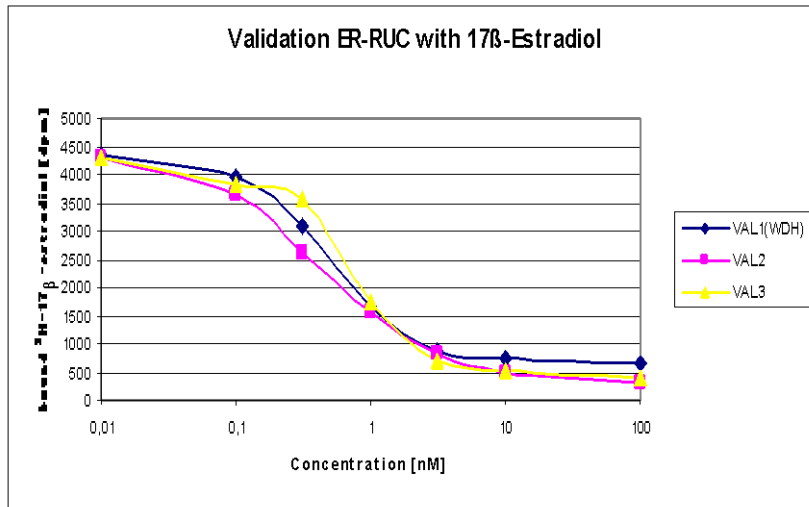
## ... zu akzeptablen Ergebnissen

---

### Androgen Receptor - Total Binding with [<sup>3</sup>H]-R1881



## ... zu akzeptablen Ergebnissen

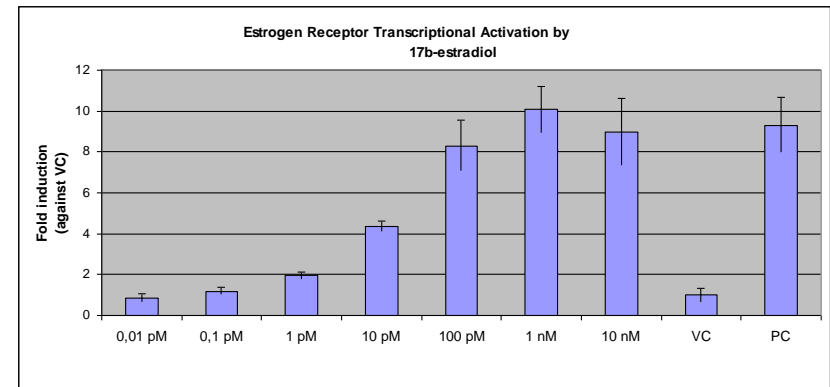
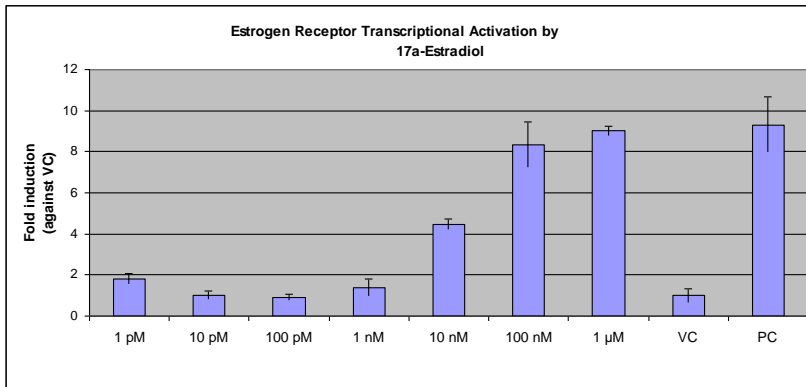
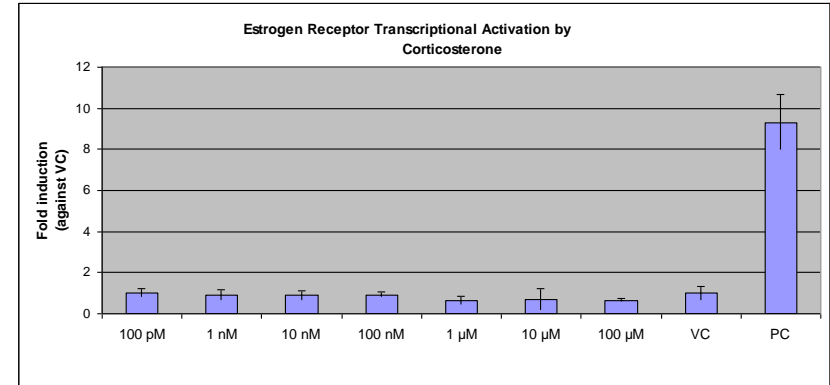
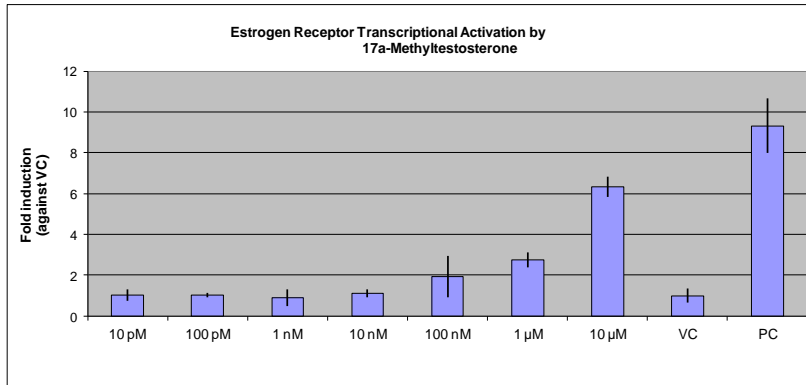


## Der lange Weg von der ersten Erfahrung.....

---

- **Estrogen Transcriptional Activation Assay** – Agonisten können als Liganden des Östrogenrezeptors fungieren und sind damit in der Lage die Transkription der Östrogen-abhängigen Gene zu beeinflussen. Diese Interaktion hat das Potential nachteilige Effekte zu induzieren, durch Störung des östrogen-regulierten Systems. Die Prüfrichtlinie beinhaltet die Aktivierung der Transkription eines östrogen-regulierten Reportergens, durch die Bindung eines Agonisten an den human ER $\alpha$ . Eine antagonistischen Interaktion mit dem Rezeptor kann nicht erkannt werden. Eine stabile transfizierte HeLa Zelllinie wird in dieser Prüfung verwendet.
- **Nur Agonisten werden erkannt**
- **Vier Kontrollsubstanzen werden in jedem Experiment mitgeführt.**
- **Durchführung von zwei oder drei unabhängigen Experimenten**

## ... zu akzeptablen Ergebnissen



Validierung mit 4 Kontrollen und 9 zusätzlich Referenzsubstanzen



## Der lange Weg von der ersten Erfahrung...

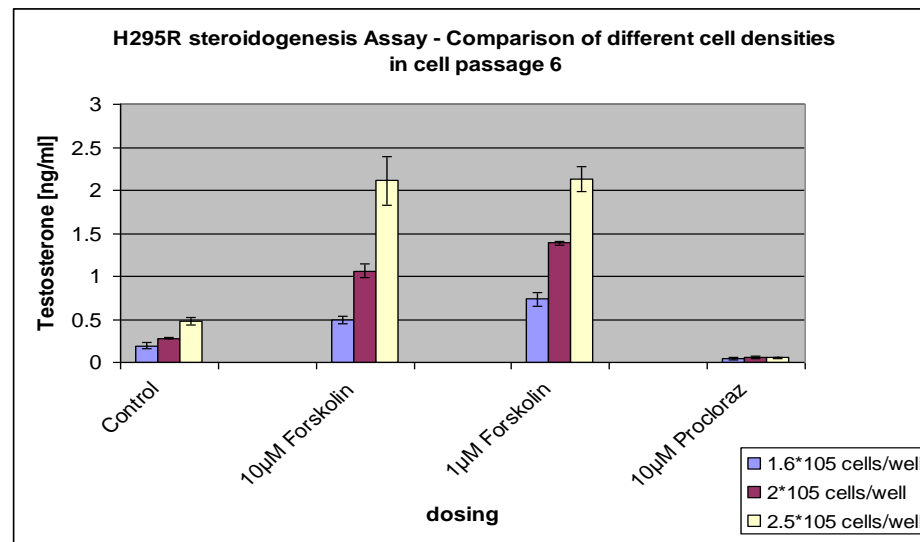
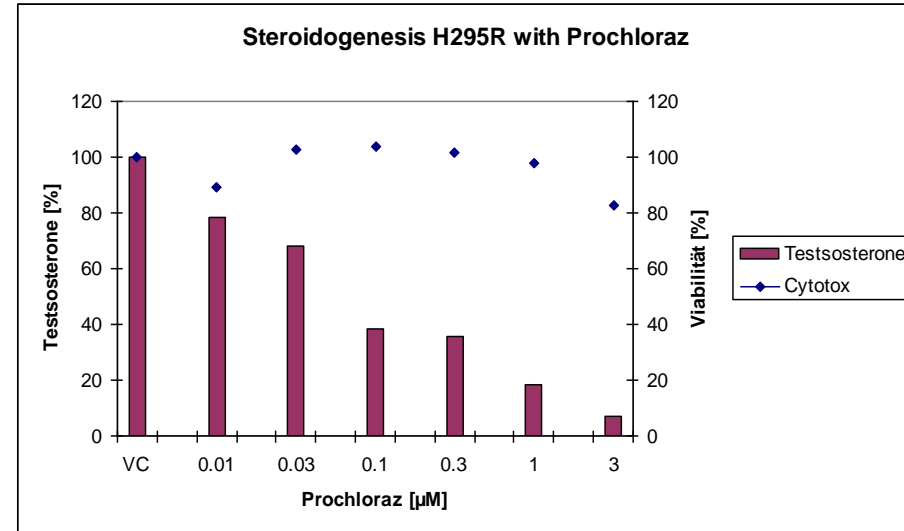
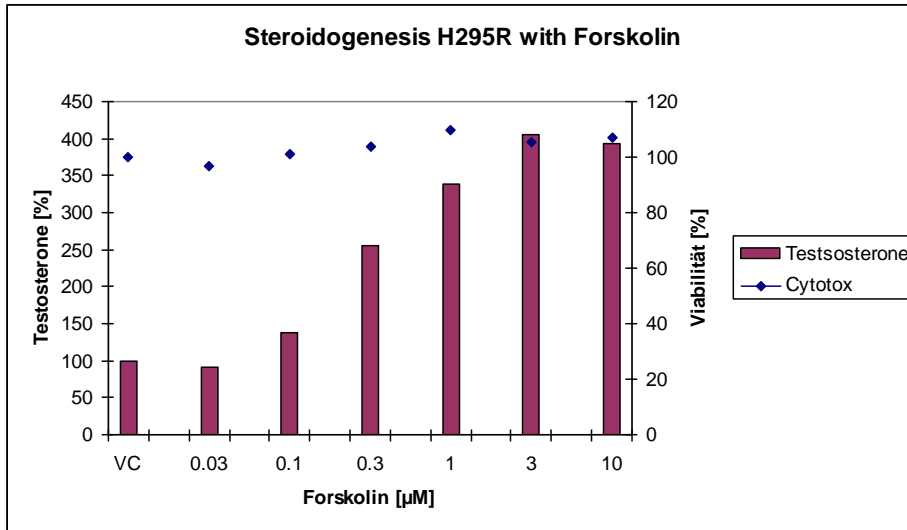
---

- **Steroidogenese** – In vitro Test erkennt die Beeinträchtigung der Produktion der männlichen und weiblichen steroiden Geschlechtshormone. Der zellbasierte Test verwendet die humane H295R adrenokortikale Karzinomazelllinie. Der Test kann Aktivatoren von Enzymen erkennen, die für die Steroidsynthese verantwortlich sind (Testosterone und Östradiol) aber auch Chemikalien die eine inhibierende Wirkung haben

### Steroidogenesis Assay

- Die zu verwendete Zelllinie ist nicht sehr stabil in der Expression der zwei zu testenden Hormon-Level (Testosteron und Östradiol)
  - ⇒ Deshalb sind die Kultivierungsbedingungen sehr kritisch
  - ⇒ Unser Labor hat auch die Messung von Progesterone in der Validierung mit aufgenommen
  - => Hoher Hintergrund von Testosteron von unterschiedlichen Quellen kann Probleme im analytischen System bedingen
  - => LCMS-MS muss ausschließlich für das EDSP reserviert werden

# ...zu akzeptablen Resultaten

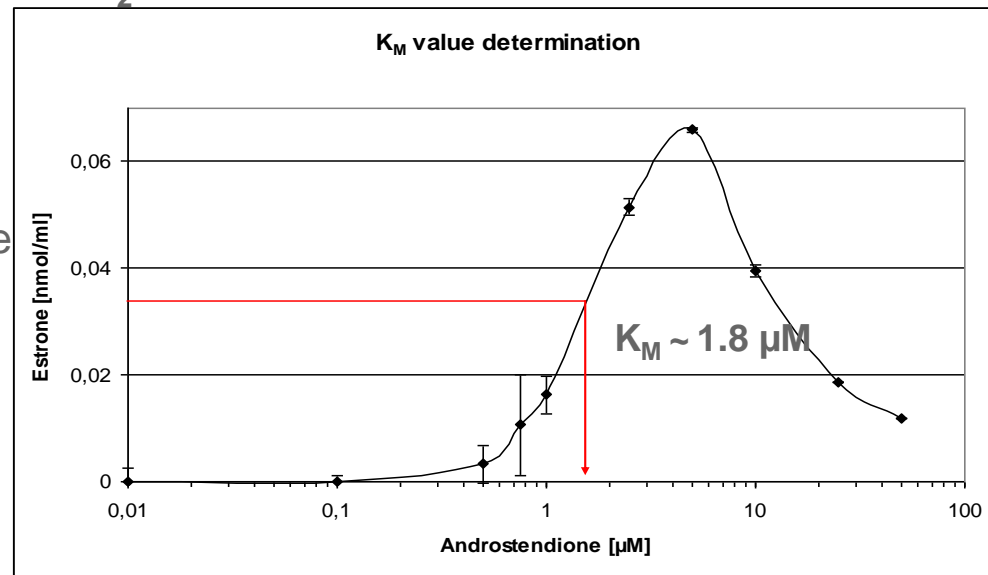


## Der lange Weg von der ersten Erfahrung...

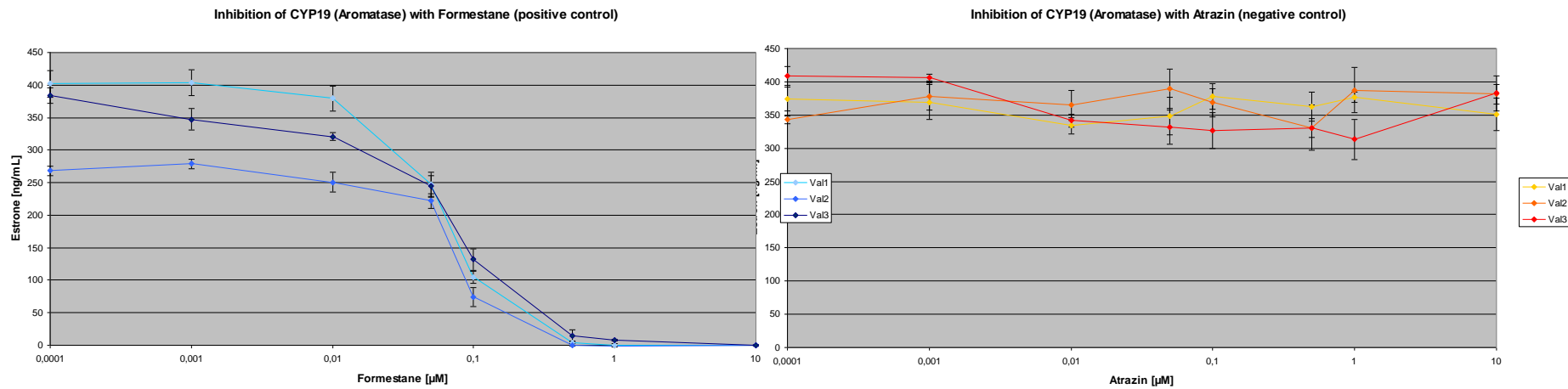
- **Aromatase** - Aromatase ist ein Enzymkomplex der für die Östrogenbiosynthese verantwortlich ist und Androgen in Östrogen, Östradiol und Östrol umwandelt. Der Aromatase *in vitro* Test stellt ein Teil des steroiden Stoffwechselweges dar, Substanzen zu erkennen, die die Aromatase Aktivität inhibieren. Rekombinante humane Aromatase (CYP19) wird verwendet



- Separation des Produkts vom Substrat durch Flüssig-Flüssig-Extr.
- Möglichkeit das Produkt direkt zu messen, mittels Massenspektroskopie



# ... zu akzeptablen Resultaten



## EDSP Tier 1 Tests – *in vivo* (1)

---

- Fisch-Kurzzeit-Reproduktionstest      OPPTS 890.1350
- Amphibien-Metamorphose-Tests      OPPTS 890.1100
- **Fisch-Kurzzeit-Reproduktionstests** – Dieser Test prüft östrogene und androgene Effekte (Funktion der HPG axis).  
Laichende Guppen von sexuell entwickelten männlichen und weiblichen Elritzen (*Pimephales promelas*) werden drei Konzentrationen der Prüfsubstanz über 21 Tage ausgesetzt. Überleben, Verhalten, Fortpflanzungsfähigkeit und Fruchtbarkeit werden aufgenommen. Körpergrösse des Fisches wird am Beginn und Ende bestimmt. Zusatzendpunkte werden bestimmt: Vitellogeninkonzentration im Blutplasma, Gonadengrösse und Gonadenhistologie (Testes und Ovarien) nach Exposition

—————> **Hauptproblem: Bruterfolg**

**Guideline verlangt 2 Männchen + 4 Weibchen In einem Aquarium mit geringer Grösse**

## Der lange Weg von der ersten Erfahrung...

---

- **Amphibien- Metamorphose Test (AMA)** – Dieser Screening-Test erkennt Chemikalien, die mit den thyroid-abhängigen Prozessen (Funktion der HPT axis) interferieren. Es ist der einzige Test der die Aktivität der Schilddrüse in einem Tier bestimmt, innerhalb seiner morphologischen Entwicklung.

Kaulquappen des Frosches *Xenopus laevis* im Larvalstadium 51 werden drei Konzentrationen der Prüfchemikalie für 21 Tage ausgesetzt. Das Überleben und das Verhalten der Larven wird untersucht als auch deren Entwicklung. Weitere Endpunkte: die hintere Gliedmaßenlänge, Körperlänge und das Körpergewicht der Kaulquappen. Am Ende wird die Schilddrüse histopathologisch untersucht.

## EDSP Tier 1 Tests – *in vivo* (2)

---

- Hershberger assay OPPTS 890.1400
- Uterotrophic assay OPPTS 890.1600
- Male pubertal assay OPPTS 890.1500
- Female pubertal assay OPPTS 890.1450

## Der lange Weg von der ersten Erfahrung...

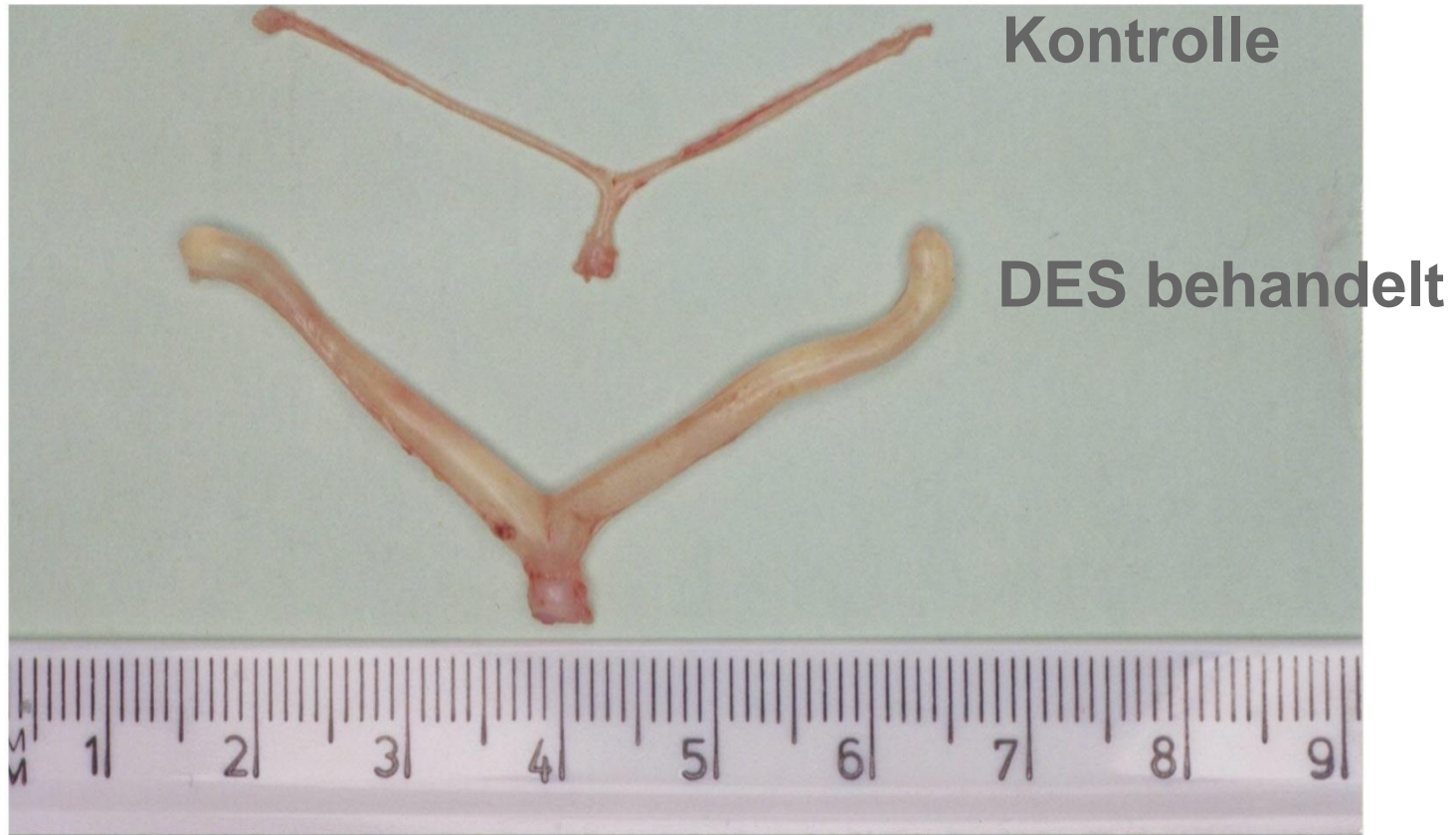
---

- **Hershberger Assay** - Hershberger assay detektiert androgene und anti-androgene Effekte. In diesem *in vivo* assay werden die Gewichte der akzessorischen Sexualdrüsen bestimmt, sowie die verschiedenen androgen-abhängigen Gewebe in kastrierten noch nicht entwickelten männlichen Ratten.
- **Uterotrophic Assay** – Der Uterotrophic assay verwendet weibliche Ratten, um östrogene Effekte zu untersuchen. In diesem *in vivo* assay, werden die Uterusgewichte in ovariectomisierten oder noch nicht entwickelten Ratten untersucht.
- Prüfrichtlinien sowohl von der OECD als auch von der US EPA OPPTS liegen vor
- Nach unserer Erfahrung erlaubt die OECD eine grössere Flexibilität bei bestimmten Aspekten der Studie, während die OPTTS Richtlinie alles standardisiert, um damit die Varianz innerhalb der Studien zu minimieren (?)
- Unterschiede innerhalb der Prüfrichtlinien zogen, innerhalb unseres Labors, Modifikationen im Prüfdesign nach sich. In der Vergangenheit wurde der Test mit intakten 19 Tage alten Ratten durchgeführt. Dieses wurde auf Grund der Anforderungen der OPPTS-Richtlinie geändert und es werden ovariectomisierte Ratten verwendet.
- **Dies bietet Anlass zu Diskussionen, welche Methode als die ethischste anzusehen ist, da die OECD beide Optionen erlaubt**



## Zu akzeptablen Resultaten

---



**Behandlung mit und ohne Diethylstilbestrol (DES)**

## Der lange Weg von der ersten Erfahrung... zu akzeptierbaren Resultaten?

---

- So wie der Uterotrophic assay verlangt der Hershberger assay eine Veränderung im Prüfdesign, nämlich die Änderung von der intakten juvenilen zur operative veränderten (kastrierten) jungen adulten Ratte.
- Nach dem EU-Tierschutzgesetz ist es notwendig zu zeigen, dass die ethischste Methode Anwendung findet. Da die OECD Richtlinie auch das intakte Tier einschließt, besteht die Möglichkeit, dass die Verwendung von operativ veränderten Tieren als die Option, die als am wenigsten ethisch angesehen wird.
- Zusätzlich zur Verwendung von endokrinen Modulatoren in der Validierung des Tests, werden für die Routinedurchführung die Verwendung von Positivkontrollen vorgeschrieben
- Im Uterotrophic assay wird eine Positivkontrolle routinemässig verlangt. Dies kann auch ein 6-Monat Intervall sein.
- Für den Hershberger assay wird explizit für jede Studie die Einbindung einer Positivkontrolle verlangt
- Deshalb sollte die Existenz zweier unterschiedlicher Prüfstrategien überdacht werden und ebenso auch die Notwendigkeit zur Durchführung von Positivkontrollen, was Anlass zu ethischen Bedenken gibt

# Der lange Weg von der ersten Erfahrung... zu akzeptierbaren Resultaten?

---

- **Pubertal Male/Female Assays** – Diese zwei Tests verwenden männliche und weibliche Ratten, um auf androgene und anti-androgene Aktivität (männliche Ratten), sowie auf östrogene (weibliche Ratten) und thyroide Aktivität (männlich und weibliche Ratten) zu testen. Die Prüfung untersucht Abnormitäten der Sexualorgane und Pupertätsmarker, als auch das Schilddrüsengewebe.

- Es existiert ein Widerspruch in den publizierten OPPTS Richtlinien für die beiden separaten Tests für männliche und weibliche Tiere:

Der Assay in männlichen Tieren präferriert die Verwendung von Sprague Dawley **oder** Wistar Ratten

Im Gegensatz verlangt der Assay in weiblichen Tieren die Verwendung von **Sprague Dawley Ratten**, als die bevorzugte Spezies

**Wenn das Labor die Validierung mit einem bestimmten Rattenstamm durchgeführt hat, kann ein anderer Rattenstamm nicht mehr verwendet werden oder aber eine neue Validierung mit dem neuen Rattenstamm hat zu erfolgen**

# EDSP Stufe 1 Prüfungen – Wirkungsmechanismen

Complementary Modes of Action among Screening Assays in the EDSP Tier 1 Battery								
Screening Assays	Modes of Action							
	Receptor Binding				Steroidogenesis		HPG <sup>3</sup> Axis	HPT <sup>3</sup> Axis
	E <sup>2</sup>	Anti-E	A <sup>2</sup>	Anti-A	E <sup>2</sup>	A <sup>2</sup>		
<b><i>In vitro</i></b>								
ER Binding <sup>1</sup>	■	■ <sup>4</sup>						
ERα Transcriptional Activation	■							
AR Binding <sup>1</sup>			■	■				
Steroidogenesis					■	■		
Aromatase					■			
<b><i>In vivo</i></b>								
Uterotrophic (Female Rat)	■							
Hershberger (Male Rat)			■	■		■		
Pubertal Male (Rat)			■	■		■	■	■
Pubertal Female (Rat)	■	■ <sup>4</sup>			■		■	■
Amphibian Metamorphosis (Frog)								■
Fish Short-term Reproduction	■	■ <sup>4</sup>	■	■	■	■	■	
<sup>1</sup> Estrogen and Androgen Receptor binding <sup>2</sup> Estrogen and Androgen <sup>3</sup> Hypothalamic-pituitary-gonadal or –thyroidal axis								

# OECD Schema zur Bewertung von ED

Mammalian and non mammalian Toxicology	
<p><b>Level 1</b> Existing Data and Non-Test Information</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Physical &amp; chemical properties, e.g., MW reactivity, volatility, biodegradability</li> <li>All available (eco)toxicological data from standardized or non-standardized tests.</li> <li>Read across, chemical categories, QSARs and other <i>in silico</i> predictions, and ADME model predictions</li> </ul>
<p><b>Level 2</b> <i>In vitro</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s) (Mammalian and non mammalian methods)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estrogen or androgen receptor binding affinity</li> <li>Estrogen receptor transcriptional activation (TG 455)</li> <li>Androgen or thyroid transcriptional activation (If/when TGs are available)</li> <li>Steroidogenesis <i>in vitro</i> (draft TG 456)</li> <li>MCF-7 cell proliferation assays (ER ant/agonist)</li> <li>Other assays as appropriate</li> </ul>
	<p style="text-align: center;"><b>Mammalian Toxicology</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Uterotrophic assay (TG 440)</li> <li>Hershberger assay (TG 441)</li> </ul>
<p><b>Level 3</b> <i>In vivo</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s)<sup>1</sup></p>	<p style="text-align: center;"><b>Non-Mammalian Toxicology</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Xenopus embryo thyroid signalling assay (When/if TG is available)</li> <li>Amphibian metamorphosis assay (TG 231)</li> <li>Fish Reproductive Screening Assay (TG 229)</li> <li>Fish Screening Assay (TG 230)</li> <li>Androgenized female stickleback screen (GD 140)</li> </ul>
<p><b>Level 4</b> <i>In vivo</i> assays providing data on adverse effects on endocrine relevant endpoints<sup>2</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Repeated dose 28-day study (TG 407)</li> <li>Repeated dose 90-day study (TG 408)</li> <li>1-generation assay (TG 415)</li> <li>Male pubertal assay (see GD 150 [<i>i.e.</i> this GD] Chapter C4.3)<sup>3</sup></li> <li>Female pubertal assay (see GD 150 [<i>i.e.</i> this GD] Chapter C4.4)<sup>3</sup></li> <li>Intact adult male endocrine screening assay (see GD 150 [<i>i.e.</i> this GD] Chapter Annex 2.5)</li> <li>Prenatal developmental toxicity study (TG 414)</li> <li>Chronic toxicity and carcinogenicity studies (TG 451-3)</li> <li>Reproductive screening test (TG 421 if enhanced)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fish sexual development test (Draft TG 234)</li> <li>Fish Reproduction Partial Lifecycle Test (when/if TG is Available)</li> <li>Larval Amphibian Growth &amp; Development Assay (when TG is available)</li> <li>Avian Reproduction Assay (TG 206)</li> <li>Mollusc Partial Lifecycle Assays (when TG is available)<sup>4</sup></li> <li>Chironomid Toxicity Test (TG 218-219)<sup>4</sup></li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Combined 28 day/reproductive screening assay (TG 422 if enhanced)</li> <li>Developmental neurotoxicity (TG 426)</li> </ul>

# OECD Schema zur Bewertung von ED

---

**Level 5**  
*In vivo* assays providing more comprehensive data on adverse effects on endocrine relevant endpoints over more extensive parts of the life cycle of the organism<sup>2</sup>

- Extended one-generation reproductive Toxicity Study (draft TG 443)
- 2-Generation assay (TG 416 most recent update)

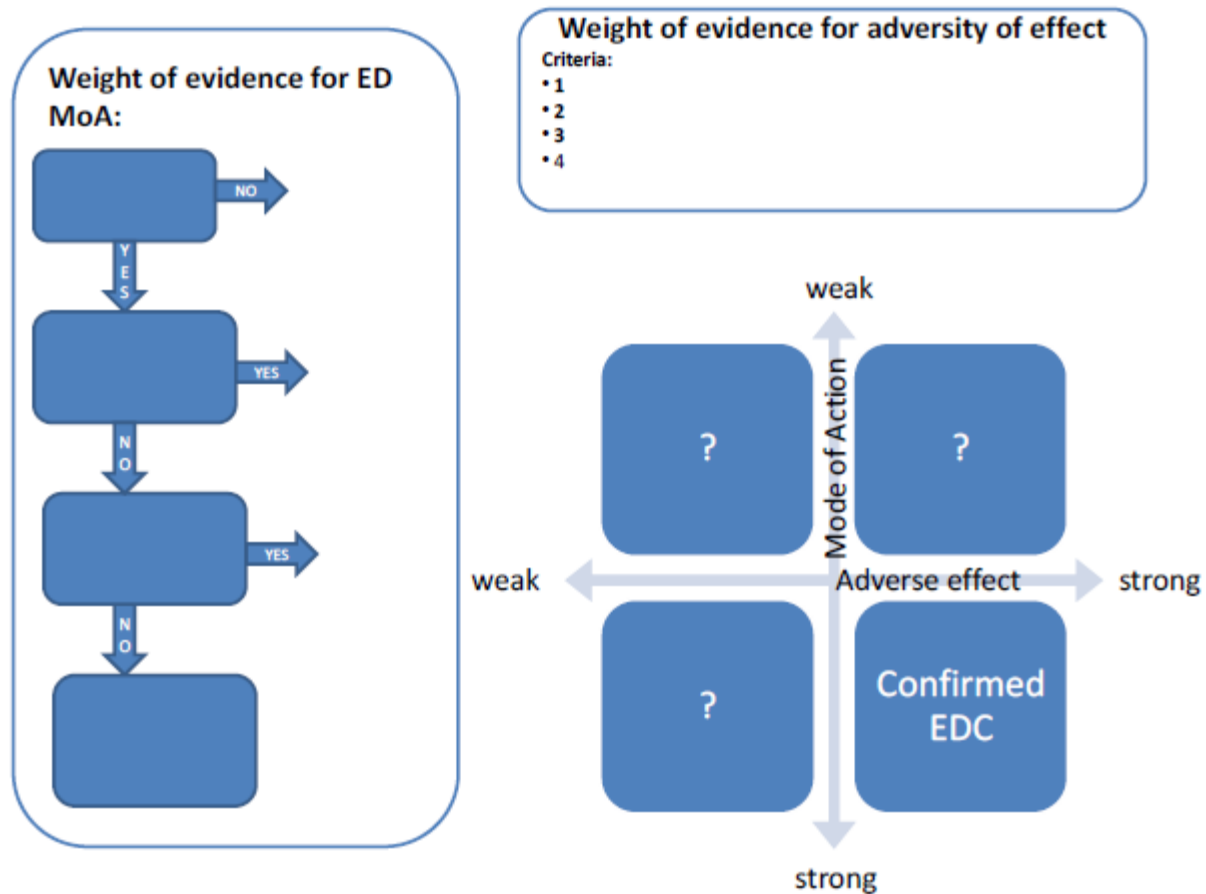
- FLCTT (Fish LifeCycle Toxicity Test) (when TG is available)
- Medaka Multigeneration Test (MMGT) (when TG is available)
- Avian 2 generation reproductive toxicity assay (when TG is available)
- Mysid Life Cycle Toxicity Test (when TG is available)<sup>4</sup>
- Copepod Reproduction and Development Test (when TG is available)<sup>4</sup>
- Sediment Water Chironomid Life Cycle Toxicity Test (TG 233)<sup>4</sup>
- Mollusc Full Lifecycle Assays (when TG is available)<sup>4</sup>
- Daphnia Reproduction Test (with male induction) (TG 211)<sup>4</sup>
- Daphnia Multigeneration Assay (if TG is available)<sup>4</sup>

# Kriterien für die Identifizierung von endokrinen Disruptoren - 3 Kriterien

---

- Auftreten eines nachteiligen Effekts in einem intakten Organismus oder der Population/Subpopulation
- Vorhandensein einer endokrinen Aktivität
- Annehmbare und begründete Beziehung zwischen der endokrinen Aktivität und dem nachteiligen Effekt

# Bewertung der Evidenz von “Mode of Action” und “Adversity”





- In 2009: Listung von 50 Aktivsubstanzen von Agrochemikalien sowie 2 Substanzen mit inerten Eigenschaften
- In 2013: Listung von 41 Aktivsubstanzen von Agrochemikalien sowie 68 Chemikalien die im “Safe Drinking Water Act” identifiziert wurden
- Ergebnisse der 2009 Liste liegen vor und wurden bewertet

# US-EPA EDSP – “Lessons Learned” in der Testdurchführung

---

- Herausforderungen in der Durchführung der in vitro Tests – Akzeptanzkriterien, Konzentrationswahl, Stabilität der transgenen Zelllinien, andere Quellen für die Androgen- und Östrogenrezeptoren (rekombinante z.B. Yes/Yas)
- Modifikationen in der Testdurchführung, abweichend der SOP's der EPA ergaben eine signifikante Verbesserung in der Bewertung der Daten
- Schwierigkeiten bei der Interpretation von Ergebnissen im Herschberger Assay, ebenso in den Pubertal male und female assays (Interpretation von Thyroid-Reaktionen)
- Vielzahl von Problemen bei den Nicht-Säuger-Tests (Amphibien test: Quelle für die Kaulquappen, Konzentrationswahl; Fisch-Kurzzeitreproduktionstest: Infektionen der Fische dadurch Zahl verringert; Konzentrationswahl, Akzeptanzkriterien)

# US-EPA EDSP – “Lessons Learned” in der Testdurchführung

---

- Tier 1 Daten sind für die Risikobewertung alleine nicht einsetzbar, da diese Tests nicht über die möglichen nachteiligen Effekte informieren, aber auch über die mögliche humane Exposition wird nicht berücksichtigt
- Hohe Konzentrationen der Prüfsubstanzen in den Testsystemen können die normalen physiologischen Funktionen stören und somit zu falsch positiven Effekten führen, die keine biologische Relevanz besitzen

# US-EPA EDSP – Praktische Anwendung der Tier 1 Daten

---

- Systematischer und transparenter “Weight-of-Evidence –Approach” ist wichtig, der Daten zur Dosis-Wirkung-Beziehung und andere wissenschaftlich relevante Daten (QSAR bzw. mechanistische Daten) einschließt, die zur Interpretation dienen, ob möglicherweise Tier 2 Daten erhoben werden
- Logisch aufgebaute “Decision-Tree” Strategie für die Tier 1 Tests sollte aufgebaut werden, die aufzeigen soll wann Tier 2 Tests in Erwägung gezogen werden sollen
- Die Auswahl der Konzentrationen in den Prüfsystemen spielt eine grosse Rolle, um biologische irrelevante Effekte zu vermeiden
- Weitere Prüfsysteme im Rahmen der OECD

Contract Research Services

**Harlan Laboratories**

Research Models and Services