

6. Praktische Anwendung und Umsetzung

Bewertungsstrategie am Beispiel einer schilddrüsenaktiven Substanz

Ulrike Schuhmacher-Wolz

FoBiG, Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH

Freiburg

www.fobig.de

UBA-Projekt

„Identifikation und Bewertung von thyreoidal wirkenden Umweltchemikalien in der Stoffregulation“

Project Nr. (FKZ) (360 01 069)

Abschlussbericht Juni 2013

Hintergrund

- **Besondere gesetzliche Regelungen für endokrin wirksame Substanzen**
 - Pflanzenschutz,
 - Biozidprodukte,
 - Chemikalien unter REACH,
 - Arzneimittel
- **Fehlende Kriterien und Teststrategien**
- **Fokus Schilddrüse**
- **Auftraggeber Umweltbundesamt: Blick auf verschiedene taxonomische Klassen**
 - Säugetiere,
 - Vögel,
 - Fische,
 - Amphibien

Ziel

- **Vorläufige Bewertungsstrategie für schilddrüsenwirksame Substanzen**
- **Notwendigkeit für weitere Tests im Rahmen der Standardtestanforderungen?**

Analyse der Ausgangssituation

- **Vergleich der Standardinformationsanforderungen in den vier Regelungsbereichen.**
- **Analyse der Standardtests hinsichtlich Informationen zu schilddrüsenspezifischen Endpunkten und Wirkmechanismen.**

Anforderungen an toxikologische Prüfungen

Toxicological Endpoint	PPP	BP	Industrial Chemicals				MP	
			Substance s \geq 1 t/a	Substance s \geq 10 t/a	Substance s \geq 100 t/a	Substance s \geq 1000 t/a	HMP	VMP
Pharmacodynamics							X	X
Metabolism and toxicokinetics	X	X		(X)	(X)	(X)	X	X
Acute toxicity	X	X	X	X	X	X	X	X
Skin and eye irritation	X	X	X (in vitro)	X (in vivo)	X (in vivo)	X (in vivo)	X	
Skin sensitization	X	X	X	X	X	X	X	
Toxicity after repeated exposure (28 days)	X	X		X	X	X	X	X
Toxicity after repeated exposure (90 days)	X	X			X	X	X	X
Genotoxicity	X	X	X	X	X	X	X	X
Long term oral toxicity	X	X				X		
Carcinogenicity	X	X				X	X	X
Screening for reproductive/developmental toxicity				X	X	X	(X) ^a	
Two generation study or EOGRT	X	X			X	X	X	X
Study on developmental toxicity	X	X			X	X	X	X

(X): no standard requirement, existing data should be documented

a: no standard requirement, only to be performed in case of special concern

(Potenziell) Schilddrüsen-spezifische Parameter in den OECD TG – toxikologische Endpunkte

Guideline	Guideline Title	Test species	Thyroid specific parameters investigated	Parameters investigated which are possibly influenced by the thyroid	Date of publication
OECD TG 422	Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/ Developmental toxicity Screening Test	Rat	TH	BW, BH ^g , hormones ^d	22 March 1996
OECD TG 443	Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study	Rat	T4, TSH, TN, TW, TH	N, SC, SMor, SM, BW, BH	28 July 2011
OECD TG 451	Carcinogenicity Studies	Rodents	TW ^a , TN, TH	BW ^a , BH	7 September 2009
OECD TG 452	Chronic Toxicity Studies	Rodents	TN, TW, TH	N ^a , hormones ^d , BW, BH	7 September 2009
OECD TG 453	Combined Chronic Toxicity/ Carcino-genicity Studies	Rodents	TN, TW, TH	N ^a , hormones ^d , BW, BH	7 September 2009

a: optional, **d:** may be necessary for an adequate toxicological evaluation, **g:** Effects on fertility, gestation, parturition, development, reproductive organ weight and histopathology

Tests zur Toxikologie

- standardmäßig meist nur TW und/oder TH
- nur EOGRT fordert standardmäßig Messungen zu Schilddrüsenhormonen; in anderen Tests nur optional

Tests zur Ökotoxikologie

- keiner der Standardtests untersucht schilddrüsen-spezifische Endpunkte
- Tests, die bei Verdacht auf ED durchgeführt werden, untersuchen keine schilddrüsen-spezifischen Parameter, außer beim AMA (amphibian metamorphosis assay)

Stoffbezogene Auswertungen

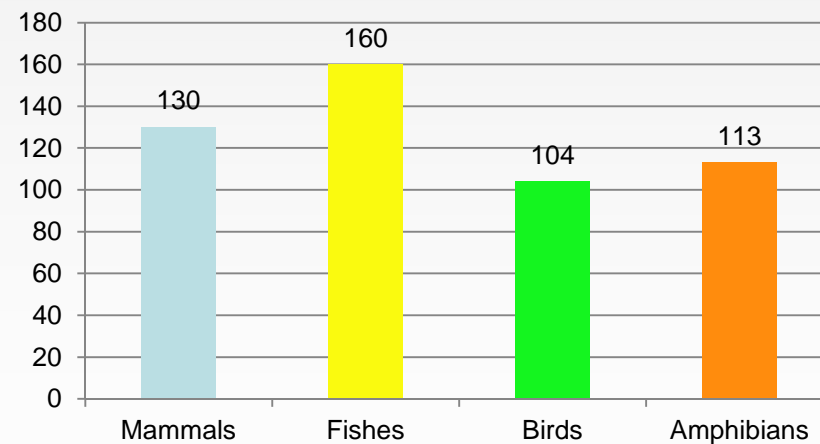
- **Substanzspezifische Daten in Organismen unterschiedlicher taxonomischer Klassen (Säugetiere, Vögel, Fische oder Amphibien)?**
- **Übertragbarkeit von Befunden zwischen den taxonomischen Klassen?**
- **Sensitivitätsunterschiede der Organismen verschiedener taxonomischer Klassen?**
- **Sensitivitätsunterschiede in den toxikologischen Endpunkten?**
- **Welche Unsicherheiten sind mit der Risikobewertung schilddrüsenaktiver Substanzen verbunden?**

Literatursuche nach thyroidal wirksamen Substanzen

- PubMed-Suche zwischen 1995 und 2012
 - Fokus: Vögel, Fische, Amphibien
 - Ergänzung mit Säugerdaten
- ➔ Substanzdatenbank
- Name der Substanz
 - Testorganismus (Name, taxonomische Klasse)
 - Effekte auf die Schilddrüse (TW, TH...)
 - MoA

Datenbank zu schilddrüsenwirksamen Substanzen

- Daten zu ca. 200 Substanzen
- insgesamt ca. 500 Einträge zu den 200 Substanzen verteilt auf 4 taxonomische Klassen



- überwiegend in vivo Daten, aber auch in vitro

Substanzen mit Daten zu allen vier taxonomischen Klassen

Substanz	CAS Nummer
2,4,6-Triiodophenol	609-23-4
4-Nonylphenol	104-40-5
BDE-47 (2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether)	5436-43-1
→ Bisphenol A	80-05-7
Cadmium chloride	10108-64-2
DDE (p,p'-Dichloro diphenyl dichloroethylene)	72-55-9
DES (Diethylstilbestrol)	56-53-1
→ HBCD (Hexabromocyclododecane)	25637-99-4
Ioxynil	1689-83-4
Malathion	121-75-5
Melatonin	73-31-4
Methimazole	60-56-0
→ PBDE (DE-71)	32534-81-9
PCB (Aroclor 1254)	11097-69-1
→ Pentachlorophenol	87-86-5
→ Perchlorate (ammonium)	7790-98-9
Propylthiouracil	51-52-5
→ Amiodaron	
→ PPP Wirkstoff X	

Beispielsubstanzen - MoA

Substanze	Proposed mode of action for thyroidal effects
HBCD	Erhöhte hepatische Enzymaktivität/erhöhte Ausscheidung von Schilddrüsenhormonen, kompetitive Bindung an TTR
PBDE	Erhöhte hepatische Enzymaktivität/erhöhte Ausscheidung von Schilddrüsenhormonen, kompetitive Bindung an TTR
Perchlorat	Hemmung des Natriumiodid-Symporters
Pentachlorophenol	Interaktion mit TSBG, erhöhte Elimination der Schilddrüsenhormone, möglicherweise Wirkung auf Hypothalamus und Hypophyse
Bisphenol A	β -TR Antagonist, hemmt T3-vermittelte Genexpression
Amiodaron	Hemmung der 5'Deiodinaseaktivität, direkt schilddrüsentoxisch, Interaktion mit den Schilddrüsenhormonrezeptoren $\alpha 1$ and $\beta 1$
PPP Wirkstoff X	Unbekannter MoA, kein eindeutiger Effekt in Säugetieren, Fischen oder Vögeln; Effekte nur in Amphibien beobachtet

Vergleich der Effektniveaus: Perchlorat

Taxonomic class	LOAEL/C for thyroidal effects (min./max.)	Toxicological target
Mammals	LOAEL min.: 0.01 mg/kg bw/day	Serum T3, T4
	LOAEL max.: 125 mg/kg bw/day	Serum T4, TSH
Birds	LOAEC min.: 0.5 mg/L (exposure via drinking water)	Thyroidal T4
	LOAEC max.: 2000 mg/L (exposure via drinking water)	Serum T3, T4, thyroidal weight
Amphibians	LOAEC min.: 0.02 mg/L	Inhibition of metamorphosis
	LOAEC max.: 0.250 mg/L	Inhibition of metamorphosis
Fishes	LOAEC min.: 0.05 mg/L	Plasma T3
	LOAEC max.: 100 mg/L	Whole body T4

Interspeziesvergleich

- **Vergleich zwischen allen 4 taxonomischen Klassen nicht möglich (unterschiedliche Informationen zur Dosis/Konzentration)**
 - binärer Vergleich: Vögel vs. Säuger oder Fische vs. Amphibien;
- **Unterschiedliches Studiendesign (in vitro/in vivo; Expositionsdauer, Expositionspfad) erschwert den Vergleich (Zeitfaktor vs. Interspeziesunterschied):**
- **Hohe Unsicherheit wegen geringer Anzahl an Substanzen und Studien;**
- **Relevanz schilddrüsenspezifischer Endpunkte für apikale Effekte unklar**

- **Amphibien empfindlicher als Fische?**

	Perchlorate	PBDE	PCP	BPA	Amiodarone	Wirkstoff X	HBCD
Mammals:	1	10	?	>1	?	1	0.07
LOAEL (thyroid)	?	1	0.45	?	?	?	?
/LOAEL (other)	?	1	1	1	?	?	1
	<1	1	>1	?	1	?	?
	?	0.1	1		2	?	>1
	<1	1	<1		?	?	
		5				?	
		3				1	
		1					
		1.875					
		>1					
Amphibians:	0.064	?	?	?	?	?	?
LOAEL (thyroid)	?		?	?		0.1	
/LOAEL (other)	?		?	1		<1	
	?			?			
	0.086			?			
	?			?			
	?						
Fish:	?	0.03	?	1	?	?	1
LOAEL (thyroid)	0.1	?	?	?	?	?	1
/LOAEL (other)	0.1	0.33		?			?
	1	1					
	<1						
	0.026						
	?						
	2						
	?						
Birds:	<1	?	?	?	?	?	3
LOAEL (thyroid)	<1	>1	?			?	?
/LOAEL (other)	?	?	?			?	?
	?					?	
	0.5					?	

Auswertung – empfindlichster Endpunkt

- **Auswertungsbias: Studien ausgewählt, um thyroidale Effekte zu dokumentieren**
 - häufig nur diesen Endpunkt angeschaut
 - kaum Guidelinestudien, insbesondere keine Langzeitstudien in Vögeln und Fischen; wenige vorhandene Studien untersuchten (meist) keine Schilddrüsenparameter
 - Amphibie: fokussiert auf Metamorphose, keine anderen Endpunkte
- ➔ Keine generalisierte Auswertemöglichkeit hinsichtlich des empfindlichsten Effekts
- ➔ Ausnahme Perchlorat: Schilddrüsenwirkung steht im Vordergrund der Effekte

Bewertung Testsysteme

- **Wie geeignet sind die vorliegenden Testsysteme?**
 - Viele (nicht validierte) in vitro Modelle; alleine nicht ausreichend um schilddrüsenwirksame Substanzen zu identifizieren
 - AMA: derzeit einziger validierter Screening-Test für schilddrüsenaktive Substanzen
 - FLCTT: Einziger Langzeittest, der in erweiterter Form Informationen zu schilddrüsen-spezifischen und apikalen Endpunkten liefert.

→ Wäre es sinnvoll andere Standardtests in Fischen bzgl. Schilddrüseneffekten zu validieren?

Konsequenzen für die Bewertung

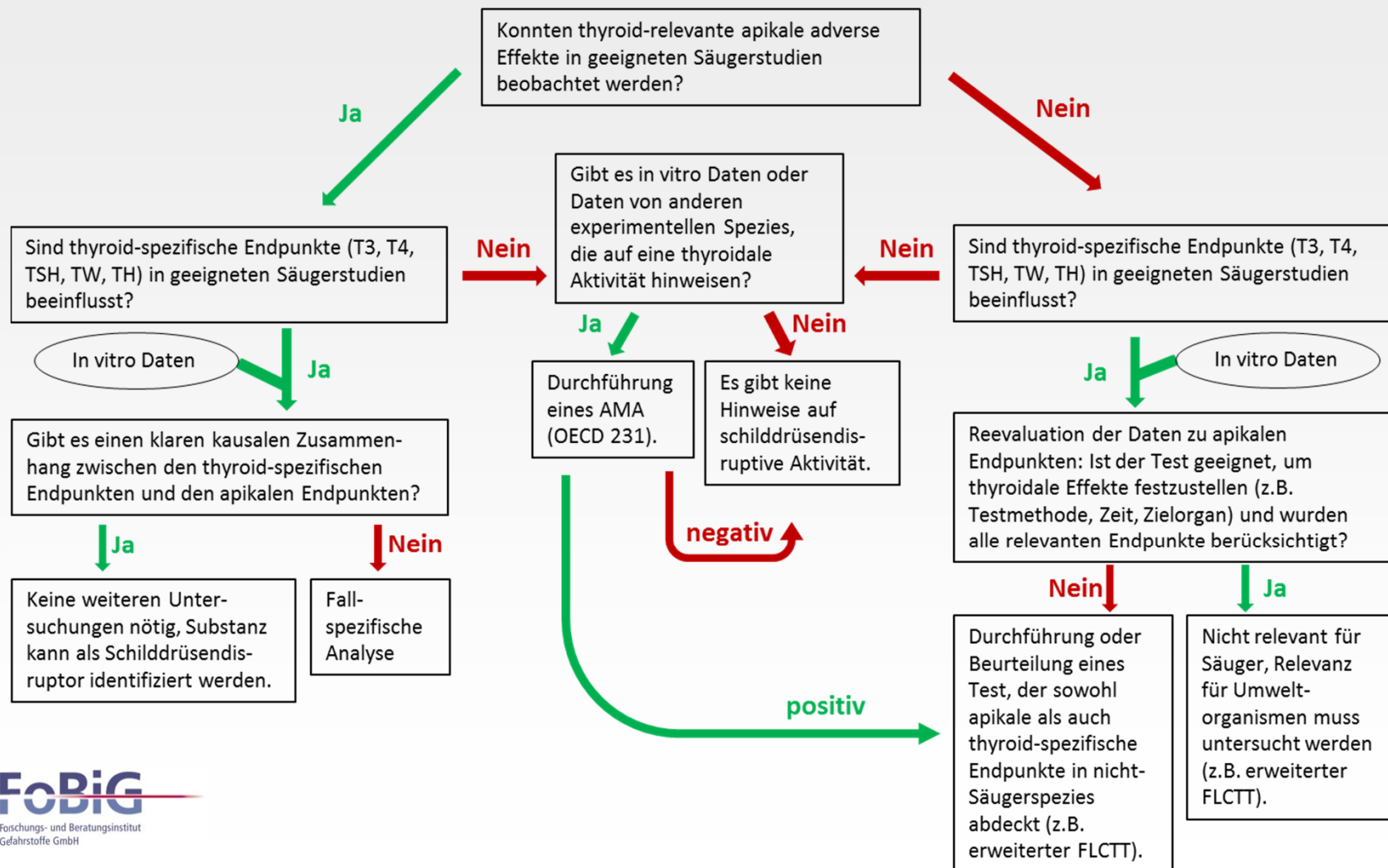
- 1. Können Schilddrüseneffekte von einer taxonomischen Klasse auf eine andere übertragen werden?**
→ Ja
- 2. Nur qualitative oder auch quantitativ?**
→ Derzeit nur qualitativ
- 3. Wie kann man sicherstellen, dass eine mögliche Schilddrüsenwirkung im Rahmen der Standardtests erkannt wird?**
→ Vorläufige Auswertung: TH und TW (neben T3 und T4) liefern klare Hinweise , zusätzliche Tests nicht notwendig
- 4. Wie geht man mit Daten besonders sensibler Organismen in der Gesamtbewertung um?**
→ Derzeit unklar.

Identifizierung eines schilddrüsenwirksamen ED

- **Beeinflussung schilddrüsenspezifischer Endpunkte**
 - Hormonkonzentrationen (T3, T4, TSH),
 - Schilddrüsengewicht (TW) oder
 - Histopathologie (TH),
- **Beeinflussung schilddrüsenspezifischer apikaler Endpunkte**
 - Wachstum
 - Reproduktionsverhalten
 - Entwicklung des Gehirns
 - Spermienentwicklung
- **Kausaler Zusammenhang zwischen schilddrüsenspezifischen und apikalen Effekten**
- **Kenntnisse zu schilddrüsenspezifischem MoA**

Teststrategie zur Identifizierung möglicher thyroid-wirksamer Substanzen

- ausgehend von bereits existierenden Säugerdaten aus Standardanforderungen -



Forschungs-/Handlungsbedarf

- 1. Messung von TH und TW in Säugerstudien ausreichend um TAS zu erkennen?**
- 2. Amphibien generell am empfindlichsten gegenüber TAS? Bedeutung für andere taxonomische Klassen (Populationsbezug)?**
- 3. FLCTT generell um Messung der Schilddrüsenparameter erweitern? Andere (Fisch-) Tests sinnvoller?**
- 4. (Entwicklung eines regulatorischen Rahmens für die quantitative Bewertung der Schilddrüsenwirkungen)**

DANKE

Eva Kaiser, FoBiG

Jasmin Brückner, UBA

Tanja Juffernholz, UBA

Anita Klein, UBA

Kathi Westphal, UBA

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

