



Udvikling af økotoxikologiske testmetoder

Gitte Petersen, Biolog, Ph.D
DHI Institut for Vand og Miljø
Afd. for Miljørisikovurdering



Økotoksikologiske testforslag til bestemmelse af hormonforstyrrende effekter

Invertebrater (reproduktions test):

- *Acartia tonsa* (marin)
- *Nitocra spinipes* (marin - brak)
- *Tisbe battagliai* (marin)
- *Amphiascus tenuiremis* (marin)
- *Daphnia magna* (fersk) – kønsratio på F1
- Guideline status: Validering igangværende



Padder (21 dage -metamorfose):

- Bagbens led; krops længde; udviklingsstadie; thyroid histologi.
- Guideline status: Validering igangværende – forventes færdig i 2006

Fisk:

- Livscyklus test (FLCT); Fish Screening Assay (FSA); Reproduktions Assay (RA); Fish Sexual Development Test (FSDT)
- Guideline status: Validering på FSA og FSDT igangværende

Hvilke(t) spørgsmål/emne var det vigtigste på dit område dengang du startede arbejdet med hormonforstyrrende stoffer

- Udvikling af kost-effektiv screening metode der er tilstrækkelig følsom og dermed ikke giver for mange falsk negative



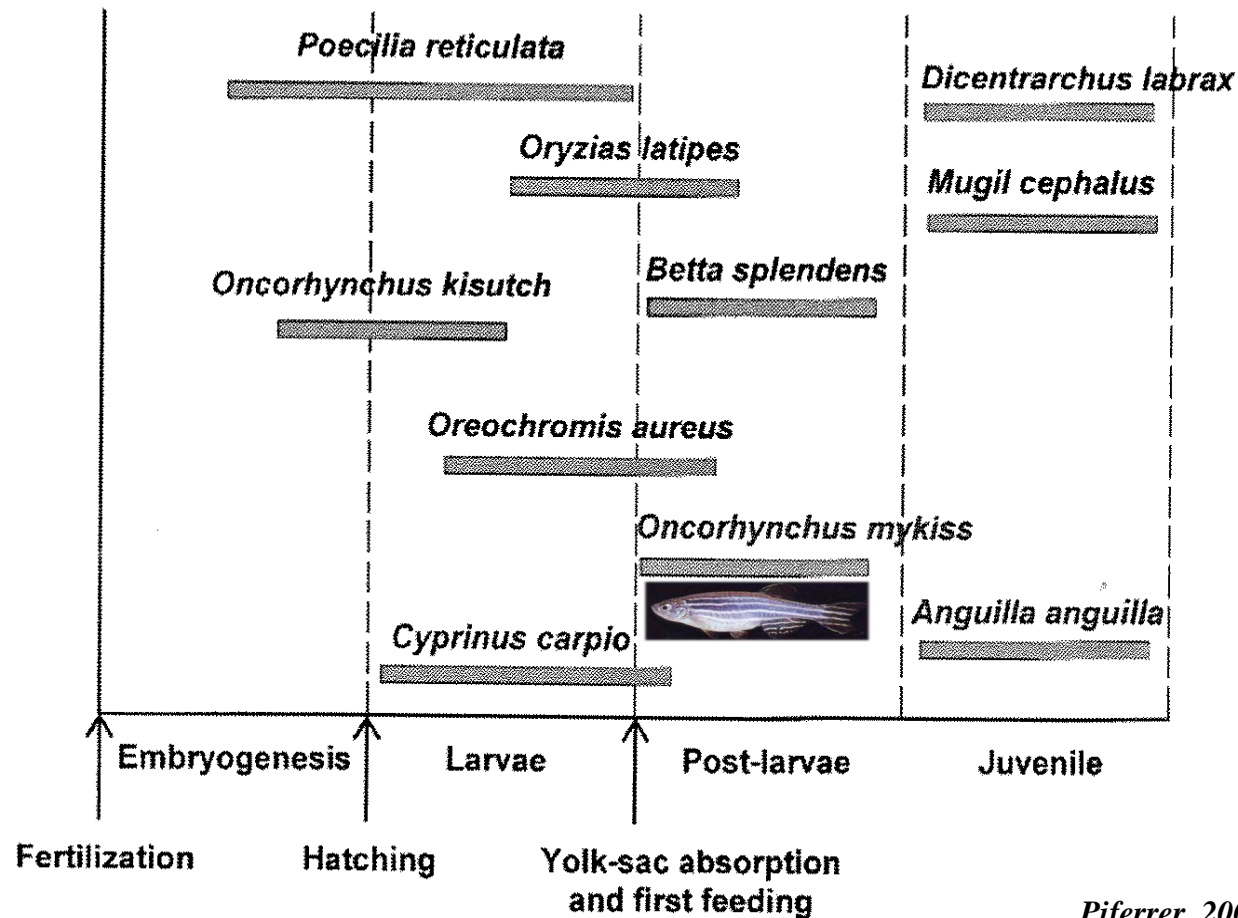
Copyright 2005 MBL Aquaculture



mike_edwardes@hotmail.com

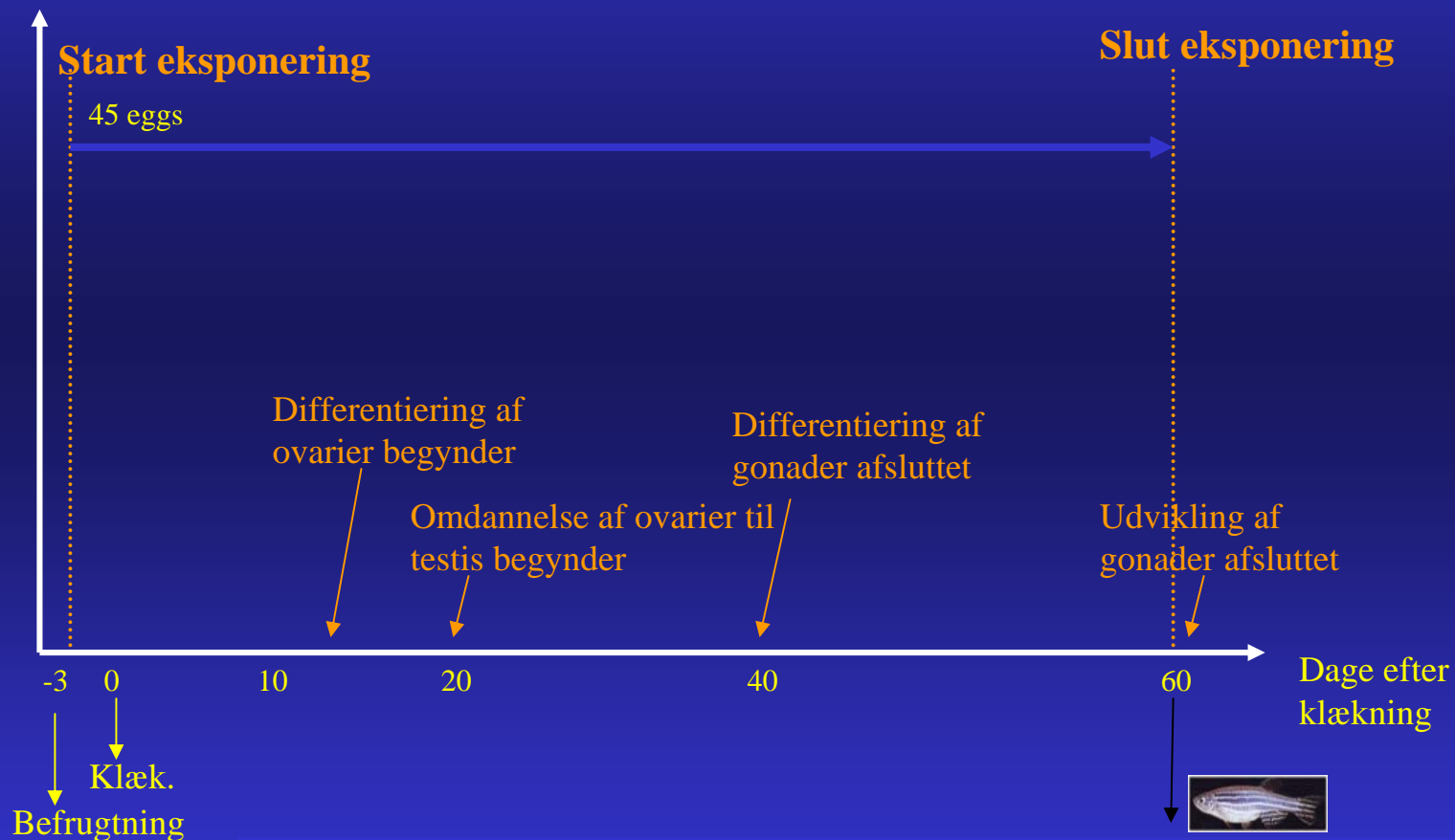


Sex labile periode for forskellige fiskearter



Fish Sexual Development Test

Eksperimentel design

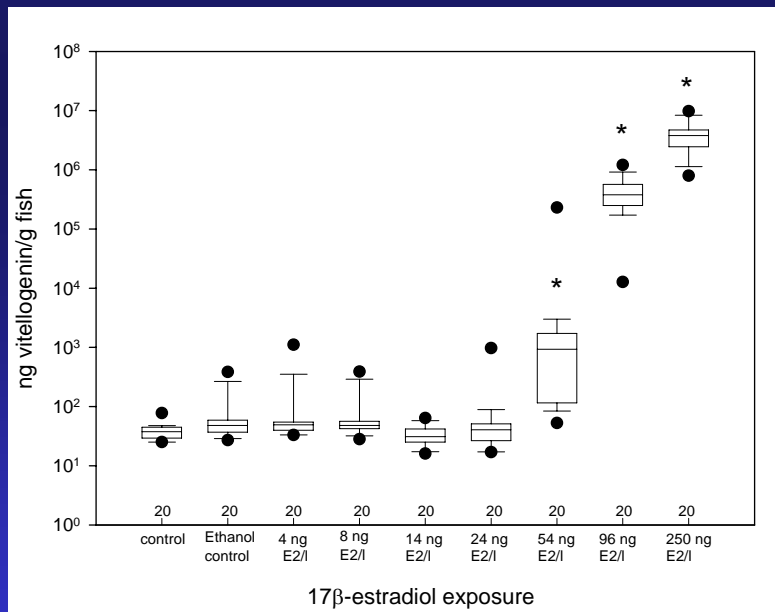


End points

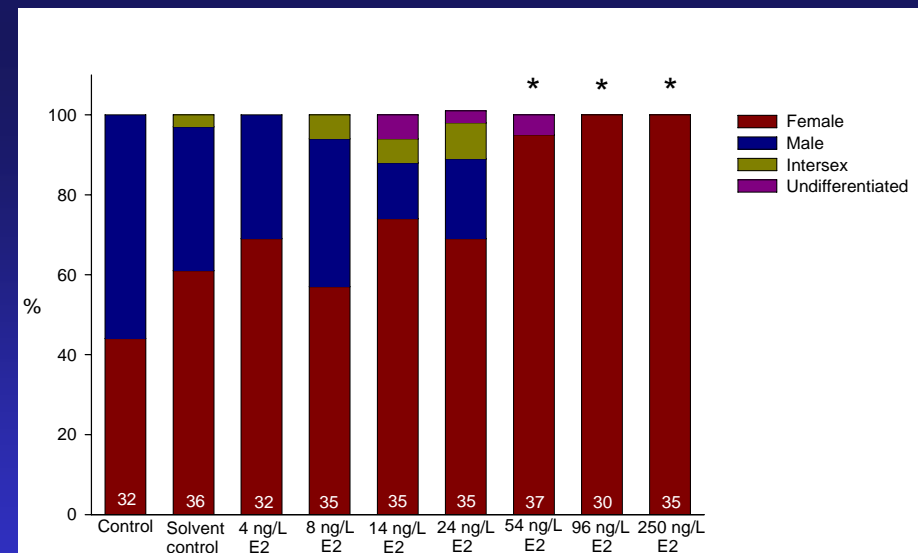
- VTG
- Growth
- Sex ratio
- Gonade histologi



Østradiol (østrogen)



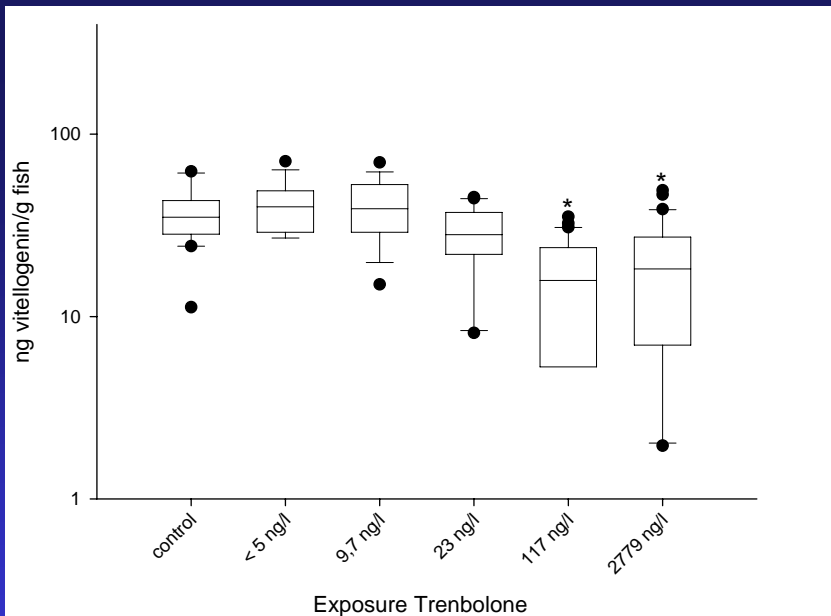
VTG



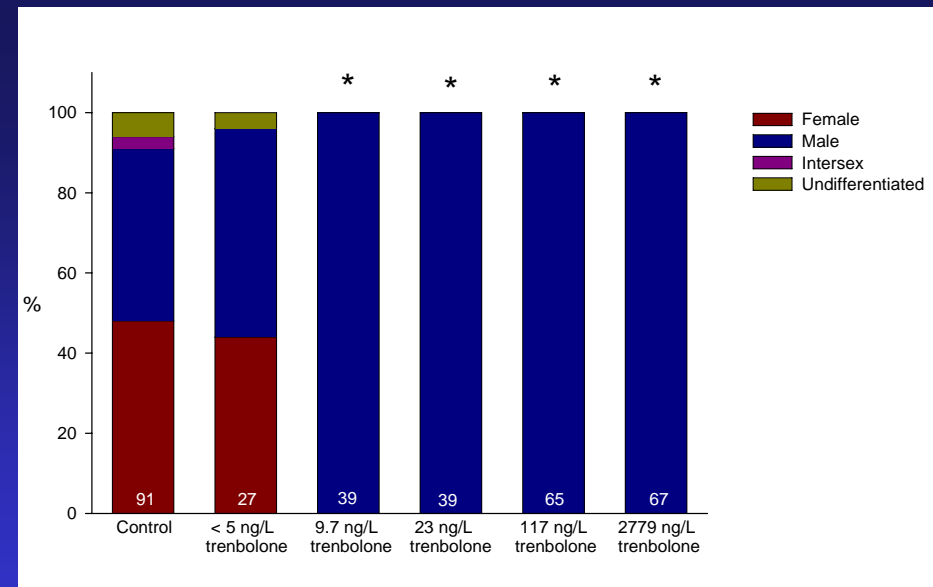
Kønratio



Trenbolone (androgen)



VTG



Kønsratio

FSDT - NOECs

Mode of action	Modelstof	Endpoint	
		VTG	Sex ratio
Østrogen	17 β -Estradiol	↑ (32 ng/l)	↑ F (54 ng/l)
Svag østrogen	4-tert pentyphenol	↑ (274 μ g/l)	↑F (68 μ g/l)
Androgen	Trenbolone	↓ (117 ng/l)	↓F (9.7 ng/l)
Anti androgen	Flutamide	Not metabolised	Not metabolised
Aromatase hæmmer	Prochloraz	↓F (202 μ g/l)	↓F (202 μ g/l)

Fiskearter

Art	Fordele	Ulemper
<p>Zebrafisk (<i>Danio rerio</i>) Mest anvendte europæiske art</p>	<p>Kort livstid Lille fisk Store mængder æg Hermafroditisk fase i udviklingen</p>	<p>Minimal sekundær kønskarakteristik Stor dødelighed de første 20 dage Svært at udtage blodprøver</p>
<p>Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>) Mest anvendte Japanske art</p>	<p>Kort livscyklus Lille fisk Store mængder æg Kønsratio er genkodet (XX/XY)</p>	<p>Minimal sekundær kønskarakteristik Lang embryo fase Svært at udtage blodprøver</p>
<p>Fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>) Mest anvendte Amerikanske art</p>	<p>Stor fisk Store mængder æg Tydelige sekundære kønskarakteristik Stor regulatorisk database i USA</p>	<p>Relativ lang livscyklus Kræver plads grundet størrelse Lang embryo fase</p>



Test systemer

Danmarks bidrag til det internationale arbejde

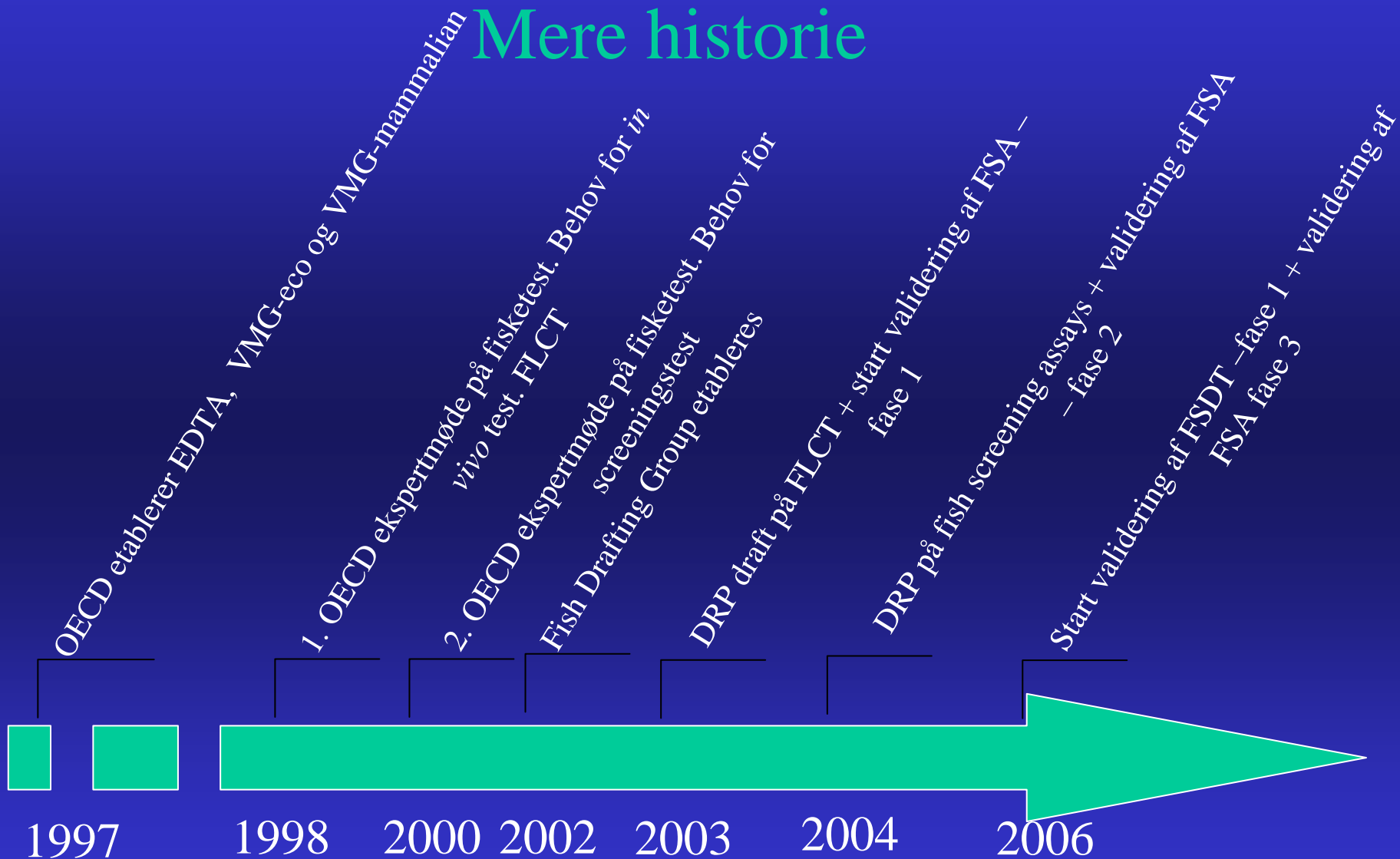
Test type	Livscyklus test FLCT	Screening test FSDT	Screening test FSA	Screening test 14+21d RA
Varighed	7-12 mdr	60 dage	21 dage	35 dage
Udviklings- stadie	Æg (F1)-> tidlig udvikling af F2	Æg -> kønsmodning	Kønsmodne fisk	Kønsmodne fisk -> reproduktion
Endpoints	VTG Reproduktion (F1) Kønsratio (F1+F2) SSC (F1+F2) GSI Gonade histologi	VTG SCC Kønsratio Gonade histologi	VTG SCC (Ægproduktion) (Befrugtningsrate) (Gonade histologi)	VTG SCC Ægproduktion Befrugtningsrate Gonade histologi
Guideline status	DRP foreligger Et egentligt testforslag foreligger ikke	DRP foreligger DK testforslag Fase 1 validering startet 2006	DRP foreligger Testforslag fra industrien foreligger Valideringsforsøg startet i 2003 Fase 3 validering i gang	DRP foreligger US-testforslag foreligger Validering ikke påbegyndt

Sammenligning af følsomhed mellem FSA og FSDT



Stof	Virkning	FSA LOEC	FSDT LOEC	Mest følsom
17b-estradiol	Østrogen	21 ng/l (VTG)	32 ng/l (VTG, kønsratio)	FSA
4-tert pentylphenol	Svag østrogen	320 µg/l (VTG)	68 µg/l (kønsratio)	FSDT
Trenbolone	Androgen	27 ng/l (SCC)	9,7 ng/l (kønsratio)	FSDT
Prochloraz	Aromatase hæmmer	300 µg/l (VTG)	202 µg/l (VTG, kønsratio)	FSDT
Octyle phenol	Svag østrogen	300 µg/l (VTG)	32 µg/l (VTG)	FSDT

Mere historie



Spørgsmål

- Hvilke(t) spørgsmål/emne var det vigtigste på dit område dengang du startede arbejdet med hormonforstyrrende stoffer
- **Udvikling af kost-effektiv screening metode der er tilstrækkelig følsom og dermed ikke giver for mange falsk negative**
- Kom dette til at passe? Og hvad er det vigtigste spørgsmål/emne nu? – hvad har haft mest betydning for udviklingen i Danmark og i hvilket omfang og hvordan Danmark evt. har bidraget til det internationale arbejde
- **Udviklingen af FSA som OECD guideline er blevet prioriteret højere end FSDT**
- **Danmark har sammen med de øvrige nordiske lande (Nordisk Ministerråd) bidraget til udviklingen af økotoks-test på hormonområdet (krebsdyr og fisk)**
- **Danmark er aktiv medspiller i VMGeco og EDTA gruppen**
- **Danmark står som 'Lead Country' for udviklingen af FSDT**
- **Danmark har bidraget i fase 3 af FSA**

Med udgangspunkt i din egen viden. Hvad er efter din mening den vigtigste prioritet i fremtiden inden for dit felt? Hvilken betydning på kort og lang sigt tror du det vil have at undlade denne prioritering?

- Udvikling af guidelines har i OECD været i gang siden 1997. I dag (2006) foreligger der fortsat ikke nogen accepteret guideline for test på miljø
- For industri og for myndigheder er det af stor vigtighed, at der foreligger internationalt accepterede metoder.
- I forbindelse med REACH indgår vurderingen af hormonforstyrrende effekter på linie med CMR og PBT stoffer i REACH forslagets artikel 56 (f) for stoffer der skal inkluderes i Annex XIV.
- Så længe der ikke foreligger standardiserede og internationalt anerkendte testmetoder til bestemmelse af hormonforstyrrende effekter vil en regulering og vurdering af hormonforstyrrende stoffer være vanskelig at gennemføre.
- Højeste prioritet er snarest muligt, at få færdigudviklet og udpeget tilstrækkeligt følsomme testmetoder til screening af eksisterende og nye kemiske stoffer