

folkehelseinstituttet

Regulatorisk toksikologi  
BIO 4530

Metoder Reproduksjonstoksikologi

Christine Bjørge  
Avdeling for kjemikalietoksikologi  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
28 April 2004

BIO 4530, 28 April 2004 1

folkehelseinstituttet

Hva jeg vil snakke om?

- Reproduksjons syklusen
- Hva indikerer svekket **formeringsevne**?
- Hva indikere svekket **fosterutvikling**?
- Testmetoder for å undersøke **formeringsevne**
- Testmetoder for å undersøke **fosterutvikling**
- Hva kreves av tester for reproduksjon i Risikovurderinger i EU?
- Oppsummering

BIO 4530, 28 April 2004 2

folkehelseinstituttet

Reproduksjon

- Viktig for opprettholdelse av arten
- Genetisk mangfold

**MEN;**  
Det er en kompleks prosess som er svært følsom for blant annet;

- miljø faktorer
- eksponering for kjemikalier

BIO 4530, 28 April 2004 3

folkehelseinstituttet

Center for the Evaluation of Risk to Human Reproduction



BIO 4530, 28 April 2004 4

folkehelseinstituttet

Viktige endepunkter i Reproduksjons-syklusen - 1

**Kjønnsmodning**  
**Kjønns celle produksjon**

- postnatal produksjon hos hanner
- produksjon hos hunner i fosterlivet (*in utero*)

**Befruktning og tidlig embryo-utvikling**  
**Zygote transport**

- fra eggleder til livmor

BIO 4530, 28 April 2004 5

folkehelseinstituttet

Viktige endepunkter i Reproduksjons-syklusen - 2

**Implantasjon**

- utvikling av placenta, overlevelse av implantet

**Embryo utvikling**

- overlevelse av embryo
- vekst og differensiering, organ utvikling

**Foster utvikling**

- overlevelse av foster
- vekst og differensiering, funksjon av organer

**Fødsel**

- lengde, amming

BIO 4530, 28 April 2004 6

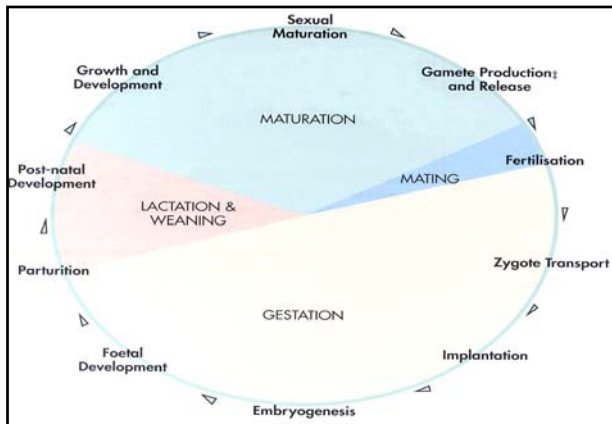
folkehelseinstituttet

## Viktige endepunkter i Reproduksjons-syklusen - 3

### Post-natal utvikling (før og etter pubertet)

- overlevelse
- fødselsvekt og vekst
- organ- hormon- immun- CNS- perifert NS- funksjon
- *anogenital distanse*
- *utvikling (tid til vaginal åpning, preputial separasjon indikerer kjønnsmodning)*
- *nedfall av testis, hypospadier, sperm produksjon*

BIO 4530, 28 April 2004 7



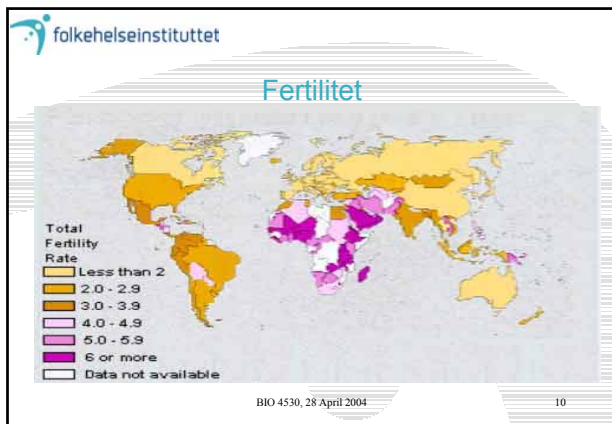
folkehelseinstituttet

## Svekket formeringsevne hos hanner/hunner

### Redusert antall befruktninger og levende avkom

- forstyrrelser opp til implantasjonen av foster i livmor
- \*skader på reproduksjonsorgan
- effekter på sperm/egg
- \*hormonelle forandringer
- \*parring, befruktning
- \*implantasjon av foster i livmoren

BIO 4530, 28 April 2004 9



folkehelseinstituttet

## Svekket fosterutvikling

Ikke-arvelige skader i fosterutviklingen opp til pubertet (utviklingsskader - misdannelser)

- kan skje under embryonal/føtal utvikling (etter implantasjonen)
- kan skje mellom fødsel og av-venning

BIO 4530, 28 April 2004 11

folkehelseinstituttet

## Risikovurderinger i EU - 1

- Identifisere kjemikalietts uheldige helse effekter (akutt, irritasjon, sensibilisering, gjentatt eksponering, mutagenitet, kreft)

*Reproduksjons toksisitet*

- formeringsevne / effekter på reproduksjonsorganer
- utviklingsskader / misdannelser

BIO 4530, 28 April 2004 12

## Risikovurderinger i EU - 2

- Fastsette NOAEL / LOAEL verdier
- Human eksponering
  - arbeidere
  - forbrukere (nyfødte, barn, gamle)
  - indirekte via miljøet
- Iverksette tiltak for å redusere risiko

## Testmetoder - 1

### Reproduksjontoksiske tester er mangfoldige:

- Fra standardiserte testmetoder iht. internasjonale aksepterte OECD Guidelines
- til mer spesialisert studie design, eksponering i følsomme "vinduer" (hormonhermere), studere mekanismer...

Data fra begge typer testmetoder blir benyttet i risiko vurderinger

## Test-metoder - 2 OECD Guideline

### Metoder for å studere effekter på formering og/eller reproduksjonsorganer

- en- og to-generasjons studier (OECD TG 415, 416)
- 28 eller 90 dager gjentatt eksponering studier (OECD TG 407 eller 408)
- Screening studier (OECD TG 421 eller 422)

## OECD 416 - 1 To-generasjons studie

- **Dekker hele reproduksjonssyklusen:** spermatogenesen, estrus syklus, parring, befruktning, drektighets perioden, fødsel, die perioden, pubertet, vekst og utvikling i to generasjoner
- **Eksponering *in utero* og post-natalt**
- **Gir info ang. effekter på fertilitet og effekter på reproduksjonsorganer i 2 (3) generasjoner, og på fosterutvikling**

## OECD 416 - 2 To-generasjons studie

- Systemisk toksisitet?
- NOAEL/LOAEL verdier for bruk i risikovurderinger
- **Ulempe** -lav følsomhet;  
Redusere kullene (4/kjønn) post-natal dag 4  
Etter pubertet går videre med 1/kjønn for å danne neste generasjon

## OECD 416 - 3 - revidert

- Følsomme endepunkter er inkludert, spesielt utvikling/differensiering av repro. systemet:
  - \*Anogenital distance
  - \*Nipples hos handyr
  - \*vaginal åpning hos hundyr
  - \*preputial separasjon
  - \*hypospadier
  - \*kvalitativ og kvantitativ vurdering av sperm
- Skal disse danne grunnlag for NOAEL verdier til bruk i risikovurderinger?

## Sædkvalitet



BIO 4530, 28 April 2004

19

## En-generasjons studie

- Gir info om effekter på reproduksjon gjennom en generasjon (range finding test for 2-gen. studie).
- Mange av de samme endepunktene som studeres in 2-generasjons studiet blir vurdert.
- **Eksponeringen hos hanner:**  
spermatogenesen pluss transit tid i epididymis, (56 dager i mus og 70 dager i rotte), deretter under parring
- **Eksponering hos hunner:**  
To estrus sykluser (2 uker), under parring, i drektighets- og i die perioden til postnatal dag 21

BIO 4530, 28 April 2004

20

OECD TG 407 28 dager gjentatt eksponering  
OECD TG 408 90 dager gjentatt eksponering

Gir tilleggs informasjon om effekter på reproduksjons organer/tyroidea (kjønnsormon nivåer, vekt/histopatologi kjønnsorganer)  
OECD 407 revideres for hormonermerere

### Ulemper;

- 28 dagers studiet varer ikke en hele spermatogenesen (48/34 dager rotte/mus)
- Bruker eldre dyr, ofte er unge dyr mer følsomme (hormonermerere)

BIO 4530, 28 April 2004

21

## Reproduction/developmental toxicity screening test, OECD TG 421/422

- Gir begrenset initsiell info, er ikke noe alternativ til OECD 414, 415 eller 416
- indikerer befruktningsevne (effekter på repro-organer) utvikling av embryo/foster.
- eksponering: 2 uker før parring, hanner 2 uker etter parring, hunner som drektige og til postnatal dag 4.
- lavt antall dyr (10)/dose gruppe - statistikk?
- få endepunkter undersøkes

BIO 4530, 28 April 2004

22

## Test-metoder - 1 OECD Guideline

### Metoder for å studerer effekter på foster utvikling (utviklingskader - misdannelser)

- Fosterutviklings studier (OECD TG 414 og 426?)
- Screening studier (OECD TG 421 og 422)

BIO 4530, 28 April 2004

23

## OECD TG 414 Prenatal Developmental Toxicity Study

- Gir informasjon om hvilke effekter pre-natal eksponering har på fosteret og på moren.
- Eksponering (20/gruppe, 3 doser/oralt) er vanligvis fra graviditetsdag 6 til 15, men kan utvides fra befruktning til en dag før fødsel
- Finner NOAEL/LOAEL for effekter på moren og på fosteret

BIO 4530, 28 April 2004

24

folkehelseinstituttet

## Forst. OECD TG 414

- **Moren undersøkes for:**  
mortalitet, kliniske forandringer, vekt, mat inntak, og annen åpenbar toksisitet
- **Livmoren undersøkes for:**  
vekt, gule legemer, implantasjoner, antall resorpsjoner, embryo/føtal død
- **Fosteret undersøkes for:**  
antall, kjønn, vekt, eksterne-, interne- og skjullet forandringer

BIO 4530, 28 April 2004 25

folkehelseinstituttet

## Forts. OECD 414

- Et kjemikalie blir betraktet som toksisk for fosteret når det gir embryo/føtale effekter i fravær av **tydelig maternell toksisitet** i studier utført etter aksepterte Guidelines (OECD Guidelines)
- Høyeste dose (av 3 doser) skal gi maternell toksisitet

BIO 4530, 28 April 2004 26

folkehelseinstituttet

## Draft OECD TG 426 Developmental Neurotoxicity Study

- Undersøker for funksjonelle og/eller morfologiske forandringer i nervesystemet hos avkommet som skyldes eksponering av moren under drektighet- og die perioden, dvs lenger eksponering og lenger oppfølgingsperiode enn OECD TG 414
- Brukes som en tilleggs test når det er mistanke om effekter på nervesystemet

BIO 4530, 28 April 2004 27

folkehelseinstituttet

## Maternell toksisitet - 1

- Er effekter på foster en primær effekt av kjemikaliet?
- Er effekter på foster en sekundær effekt som skyldes at kjemikaliet er toksisk for moren?
- Viktig ved klassifisering av kjemikalier som skadelige for fosterutvikling

BIO 4530, 28 April 2004 28

folkehelseinstituttet

## Maternell toksisitet - 2

- Er toksisitet hos moren tilstede ved samme doser som er toksisk for avkommet?
- Hva er den maternelle toksisiteten?  
Redusert vekt (10%)?  
Redusert matinntak (10%)?
- Er effekter funnet i samme enhet (mor/avkom)?
- Studere individuelle data

BIO 4530, 28 April 2004 29

folkehelseinstituttet

## Maternell toksisitet - 3

- Dose respons; fosterdød ved høye doser kan gjemme en annen effekt hos fosteret
- Hvordan fosteret er plassert i livmoren, ved siden av male eller female (hormonhermere)?
- Statistisk signifikant, ikke alltid relevant (ved sjeldne effekter)
- vurdere effekter på kullnivå
- vurderes "case by case"

BIO 4530, 28 April 2004 30

folkehelseinstituttet

## EU sin testing strategi for Reprotoks i henhold til White Paper

- **1 - 10 tonn/år**  
*in vitro* studier (stem cell, whole embryo culture, micro mass assay)
- **10 - 100 tonn/år**  
Screening studier OECD TG 421, 422
- **100 - 1000 tonn/år**  
to-genrasjons studie OECD 416  
developmental toxicity study OECD 414

**Skreddersy testprogram for hvert kjemikalie**

BIO 4530, 28 April 2004 31

folkehelseinstituttet

## White paper

### Ny kjemikalie politikk i EU innen 2005+ fordi:

- Dagens system gikk for tregt til å fremskaffe data og vurdere risiko
- Nye og eksisterende kjemikalier reguleres under felles system: REACH  
**Registration Evaluation Authorisation Chemicals**
- Begrense og erstatte bruk av farlige kjemikalier (POPs og CMR kjemikalier, EDS?)
- Benytte **føre var prinsippet** og **substitusjon**

BIO 4530, 28 April 2004 32

folkehelseinstituttet

## Oppsummering

### Metoder Reproduksjonstoksikologi

fertilitet og/eller reproduksjonsorganer  
fosterutvikling

- Basert på data ved bruk av internasjonale aksepterte Guidelines (OECD)
- Fastsetter NOAEL/LOAEL verdier for bruk i Risiko karakterisering
  - \*Hva er kritisk effekt?
  - \*Er effekten primær eller sekunder til maternell toksisitet?

BIO 4530, 28 April 2004 33

folkehelseinstituttet

BIO 4530, 28 April 2004 34