

**Alternative Testverfahren und intelligente
Teststrategien:**

Position aus Sicht der Wissenschaft

Berlin 23. Juni 2005

Prof. Dr. Helmut Greim

Technische Universität München

Institut für Toxikologie und Umwelthygiene

Definitionen

Gefährlichkeit

(Hazard)

qualitativ

Risiko

(Risk)

quantitativ

Kritische Endpunkte

Mechanismen

Dosis-Wirkungsbeziehung

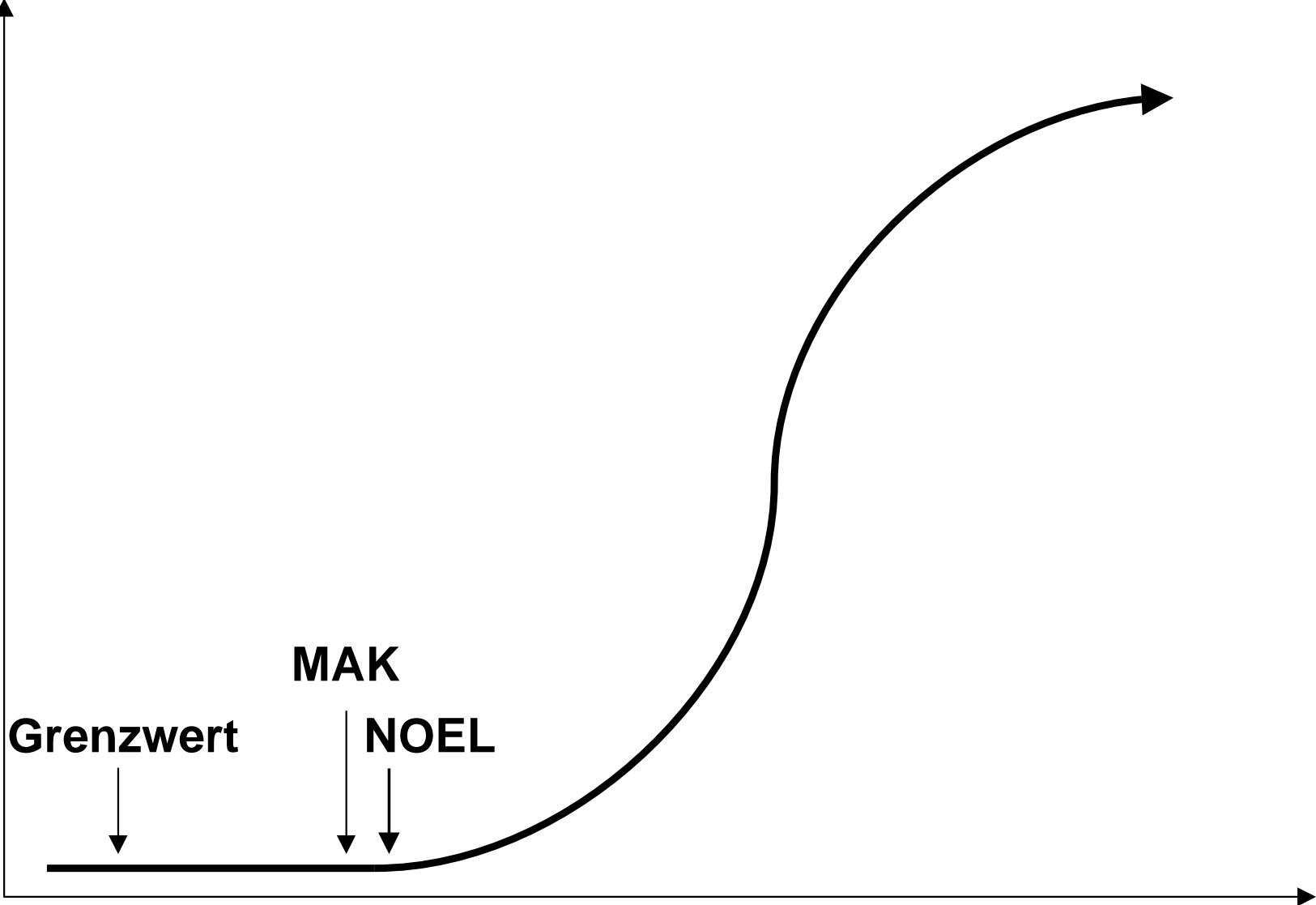
Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Schädigung bei bestimmter Dosis oder Abstand zwischen NOEL und Exposition (Margin of Exposure)

Dosis: Exposition pro Zeit

Die Elemente der Risikocharakterisierung

- 1. Toxische Eigenschaften, Toxikokinetik, Wirkungsmechanismus bei akuter und chronischer Exposition**
- 2. Dosis – Wirkungsbeziehung**
- 3. Exposition**
- 4. Ermittlung des Risiko durch Verknüpfung von 1, 2 und 3**

Wirkung



Grenzwert

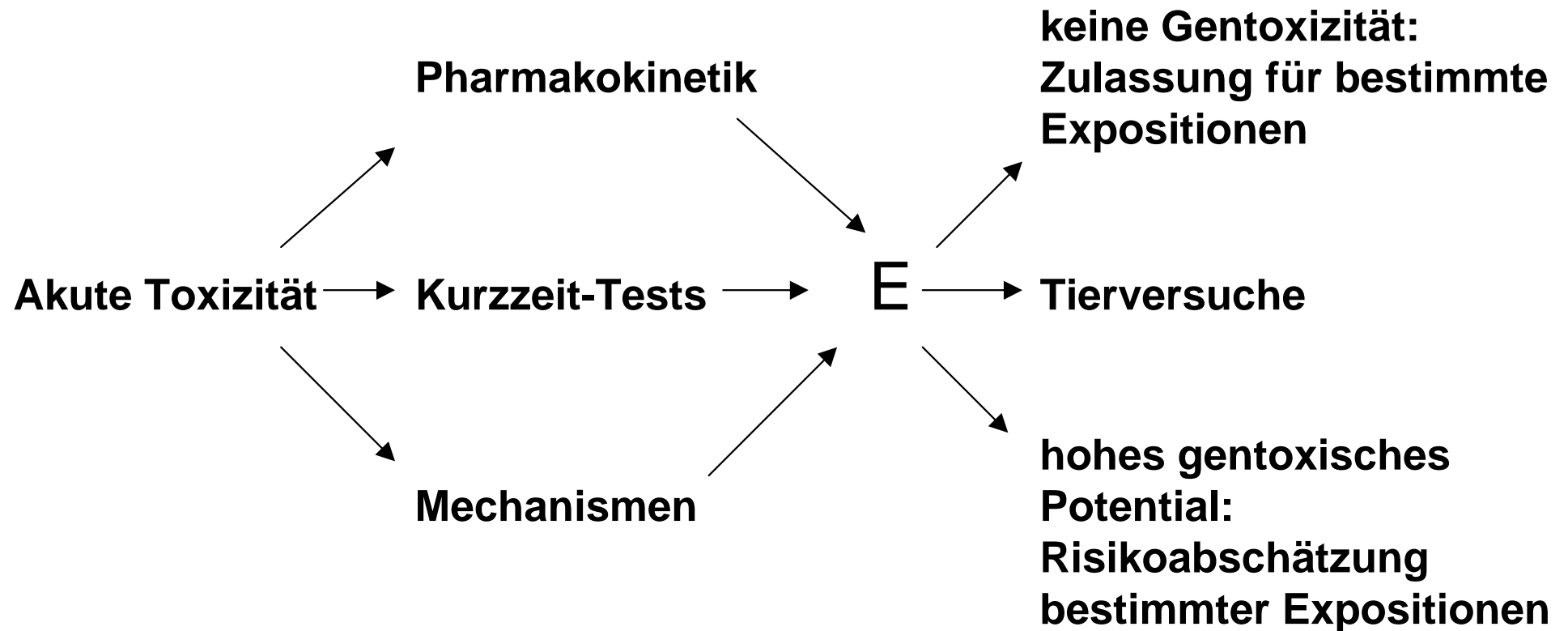
MAK

NOEL

Sicherheits-Abstand

Dosis

Vorgehensweise bei der toxikologischen Bewertung von Chemikalien



Bewertung einer Chemikalienexposition

Genotoxizität: in vitro, ggf. in vivo

Metabolismus: Relevanz der Genotox.-Daten

NOEL: (akute), wiederholte Applikation, mindestens 28 Tagetest, je nach Exposition oral, inhalativ, dermal

Exposition: tägliche Dosis

Bewertung: Vergleich NOEL mit Exposition

Prüfanforderungen für REACH

t/a	> 1000	<100 t/a	10-100	1-10 t/a
Toxikologie	beurteilen	beurteilen	beurteilen	
Akute Toxizität			oral, dermal, Inhalation	
Irritation			Haut/Auge <i>in vivo</i>	Haut/Auge <i>in vitro</i>
Sensibilisierung	Immuntox	• Immuntox	• Immuntox	• LINA
Wiederholte Applikation	≥12 Mo	• 90Tage	• 28Tage	
Genotoxizität/ Karzinogenität	Mutagen/ Karzinogenität	In vivo mutagenität •	Zytogenet. Genmutat. • <i>in vitro</i>	Bakterien- Tests • <i>in vitro</i>
Reproduktion		Entwicklung, 2-Generation	Repr/Entw. screen test, •	
Zahl der Stoffe	2.600	2.900	4.600	20.000
Zeitraumen	20058	200811	201116	2016 ²

Stellungnahmen wissenschaftlicher Gremien

CSTEE Opinion zum BUAV-ECEAE report (2004):

“The way forward - Action to end animal toxicity testing”

“*In vivo* toxicological testing addresses both hazard identification and evaluation of dose-response relationship. The latter is an essential aspect of risk assessment. The BUAV-ECEAE report only addresses hazard identification. The omission of dose-response assessment is a serious deficiency in their report.”

“Since *in vitro* cell culture models cannot account for “unknown” mechanisms of action, which are detected in live animals (where all the relevant interactions occur), the predictive value of non-animal alternative tests is limited at present. The same is true for the proposed computer-based evaluations.”

Teststrategie nach TGD

zur Genotoxizität

Bact.	MCGT	In vivo	Kommentar
-	-	bewerten	jeweils
+	-	+	case by
-	+	+	case-
±	+	+	Betrachtung

Enzyme, die im S9 unter Standardbedingungen inaktiv sind oder fehlen

Inaktiv (Kofaktor-Mangel)	Fehlen im S9
Acetyltransferase	Glukosidasen
Glutathione-S-Transferase	Glukuronidasen
Sulfotransferase	Prostaglandin-Synthase
UDP-Glukuronosyltransferase	Myeloperoxidase
	γ -Glutamyltranspeptidase

Liegt kein 28-Tage-Test bzw. kein weiterer Test mit wiederholter Verabreichung vor, ist keine Aussage über Organspezifität, Dosis-Wirkung und NOEL einer Substanz bei längerfristiger Exposition des Menschen möglich.

Der gewählte Expositionsweg hängt ab von der zu bewertenden Situation:

Inhalation: Arbeitsplatz und Umgebungsluft

Oral: Kontamination von Nahrungsmittel

Dermal: Arbeitsplatz, Kosmetika

Alternativ: orale Studie und Information über Hautpenetration

Computersysteme zur Vorhersage und Beurteilung toxischer Effekte von chemischen Stoffen.

Stellungnahme der Gesellschaft für Toxikologie (2004):

Eine wesentliche Einsparung von Tierversuchen durch die alleinige Verwendung von computergestützten Vorhersagesystemen ist in naher Zukunft nicht zu erwarten. Wie oben geschildert ist die Mehrzahl der toxischen Effekte derzeit noch schlecht vorherzusagen.

Allerdings ist davon auszugehen, dass computergestützte Verfahren für einige mechanistisch klarer umrissene Endpunkte mit guter Datenbasis (ätzende Wirkung, Reizung) in Zukunft ihren festen Platz in einem abgestuften Prüfverfahren haben werden. Sinn dieses abgestuften Verfahrens ist es, eindeutig positiv vorhergesagte und von einem Experten ebenfalls so bewertete Stoffe nicht der experimentellen Prüfung zu unterziehen.

Methylacetat

Irritation:	NOEC	Tier: keine Daten
		Mensch: 200 ppm, 2 Std., 2x/d
Systemisch:		Azidose durch HCOOH Bildung
	oral, Inhalation	Tier: unzureichende Daten
		Mensch: keine Daten

Methylacetat wird vollständig zu Methanol metabolisiert.

Gleiche Expositionen gegenüber Methylacetat und Methanol führen zu gleichen Konzentrationen an Ameisensäure im Urin.

MAK (Methanol): 200 ppm

KZW (Methanol): 800 ppm

Schwefelkohlenstoff

Irritation:	NOEC 120 ppm Ratte 24 Std., 13 w
Systemische Wirkung:	Neuro-, Kardiotoxizität
NOEC:	Tiere: 150 ppm (bis zu 15 m)
	Mensch: 4 ppm (wiederholt. Expos.)

In kontrollierten Studien und Erfahrungen am Arbeitsplatz eindeutige Effekte bei 10 ppm, nicht eindeutig zwischen 4 und 10 ppm, in keiner Studie Wirkungen bei 4 ppm.

Exposition in früheren Studien wahrscheinlich überschätzt.

MAK (preferred value approach): 5 ppm, KZW: 10 ppm

Toxizität gradkettiger Alkane

Methan	Asphyxie durch O ₂ -Verdrängung
Ethan	Asphyxie durch O ₂ -Verdrängung
Propan	ZNS-Depression bei hoher Konz.
Butan	ZNS-Depression bei hoher Konz.
Pentan	ZNS-Depression bei hoher Konz.
Hexan	periphere Neurotox. durch γ -Diketon
Heptan	40-fach geringere γ -Diketon-Bildung
Octan	ZNS-Depression bei hoher Konz.
Nonan	ZNS-Depression bei hoher Konz.

N-Hexan

Irritation: NOEC

Tier: Keine Daten

Mensch: 500 ppm (3-5 min)

Systemisch:

periphere Neurotoxizität

NOEC Inhalation

Tier: 100 ppm (Ratte 16 w)

Mensch: 58 ppm (Ø 40-88 ppm)

In epidemiologischen Studien kein Hinweis auf periphere Neurotoxizität bei 40-88 ppm, allerdings unzureichende Daten zur Exposition.

Metabolismus zu γ -Diketon.

(Bildung von γ -Diketon aus **n-Heptan** etwa 10fach geringer).

MAK: 50 ppm

KZW: 400 ppm

Fazit

Intelligente Prüfstrategien als Kombination aus *in vitro* und *in vivo* Testverfahren werden schon aus Kostengründen seit Jahrzehnten eingesetzt.

In-vitro-Systeme können erfassen

die Zytotoxizität und Genotoxizität einer Substanz und bei entsprechender Enzymausstattung auch der Metaboliten.

Metabolismus und Wirkungsmechanismus.

Die Relevanz der gewonnenen Informationen ist nur durch Untersuchungen im intakten Organismus zu bewerten.

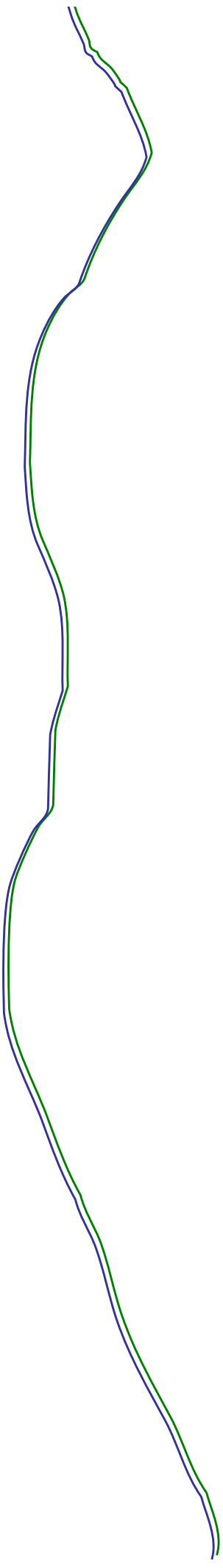
Organspezifität und Wirkungsstärke einschließlich NOEL bei wiederholter Exposition sowie Dosisabhängigkeit des Wirkungsmechanismus lassen sich nur in entsprechenden Tierversuchen oder Erfahrungen beim Menschen ermitteln.

Gefährliche Stoffeigenschaften (Hazard-identification)

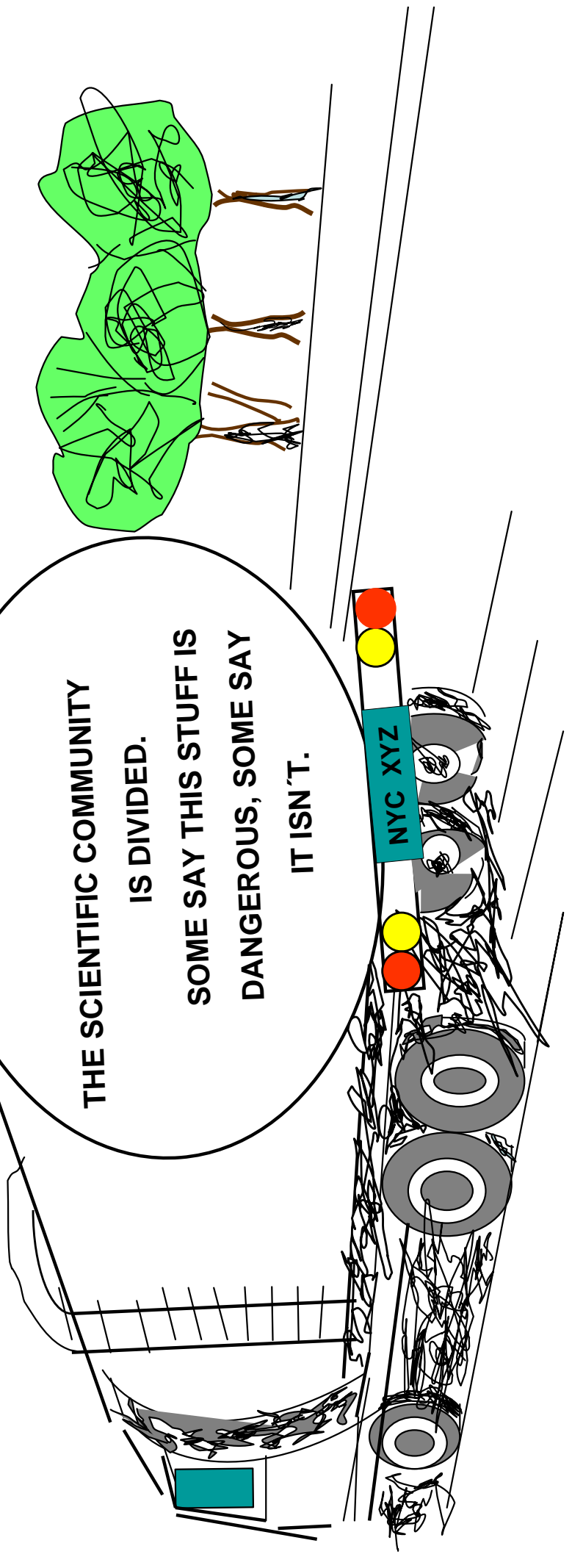
- **Akute Toxizität**
- **Toxikokinetik**
- **Metabolismus**
- **Haut-, Schleimhautreizung**
- **Sensibilisierung**
- **Chronische Toxizität**
 - Organspezifität**
- **Genotoxizität**
- **Kanzerogenität**
- **Reproduktionstoxizität**
- **Mechanismen**

Risikobewertung (Risk-assessment)

- **Reversibilität**
- **Dosis-Wirkung**
- **NOEL**



THE SCIENTIFIC COMMUNITY
IS DIVIDED.
SOME SAY THIS STUFF IS
DANGEROUS, SOME SAY
IT ISN'T.



Literaturrecherche für Stoffe >100 t/a

mit vermutlicher Verbraucherexposition

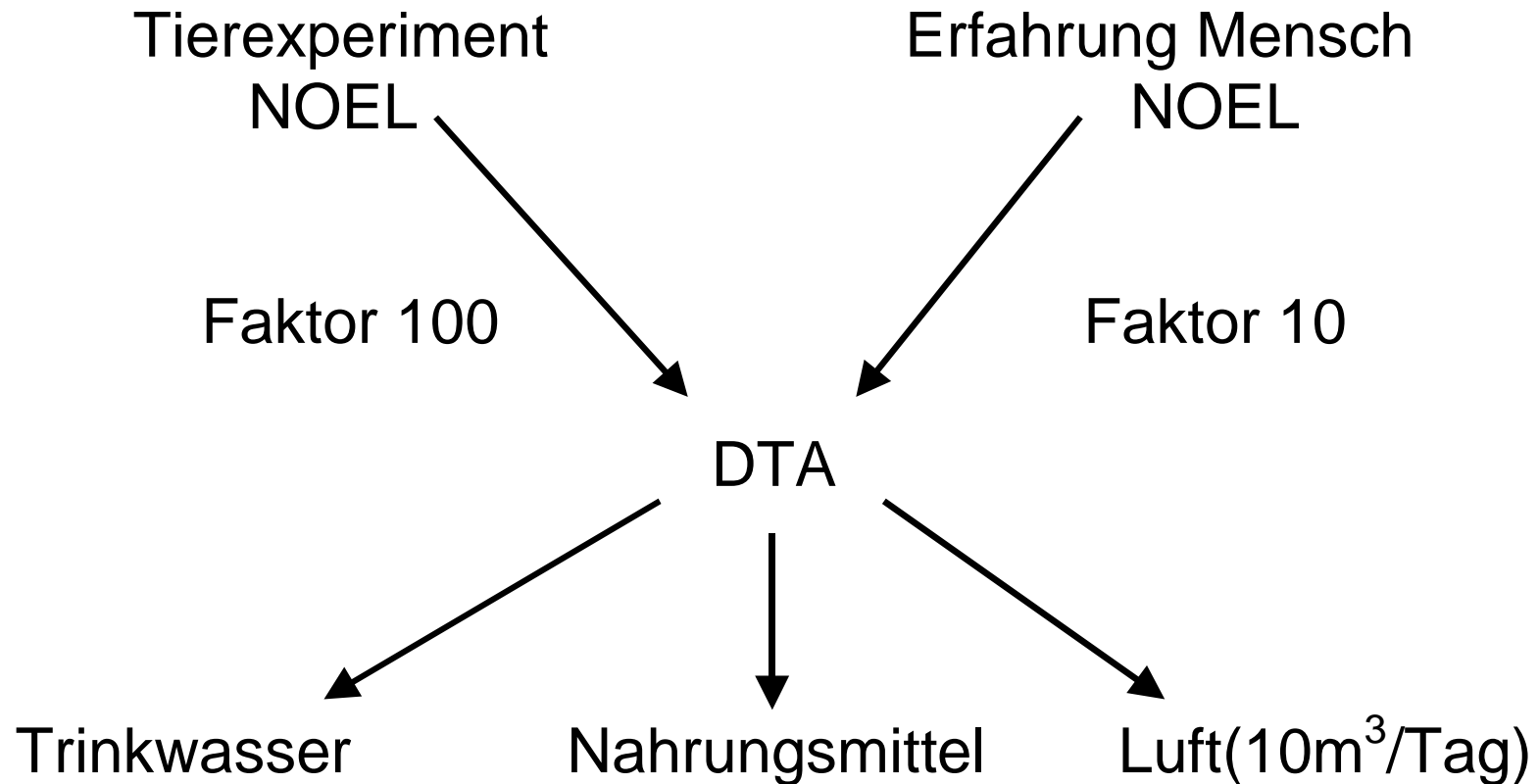
Substance	Sensitization	Subchronic Test	Genotox Tests
alpha-Amylcinnamaldehyde	+	?	+
Methyl ionone (mixture of isomers)	+	-	-
beta-Ionone	-	?	+
Piperonal	+	?	+
Trichloromethyl phenyl carbonyl acetate	+	?	-
Methyl beta-naphthyl ketone	+	?	+
Hydroxycitronellal	+	-	+
Methyl anthranilate	+	+	+
p-Methoxybenzaldehyde	+	-	+
Musk xylol	+	+	+
Musk ketone	+	+	+

Literaturrecherche für Stoffe >1000 t/a

mit vermutlicher Verbrauchereexposition

Substance	Sensitization	Subchronic Test	Genotox Test
Linalool	+	?	+
Linalyl acetate	+	?	+
alpha-iso-Methylionone	+	?	-
Benzyl salicylate	+	?	-
Hexyl salicylate	+	-	-
Dihydromyrcenol	+	-	-
dl-Citronellol	+	-	-
Geraniol	+	+	-
Terpineol	+	-	-
Phenethyl alcohol	+	-	-
Acetyl cedrene	+	-	-

Abschätzung von „Grenzwerten“ in Luft, Nahrungsmitteln und Trinkwasser



Nahrungsmittel : 90%, entspr. Verzehrgewohnheiten

Luft : 10 % der DTA

Trinkwasser : 1 % der DTA (EC–Guidelines 1984)