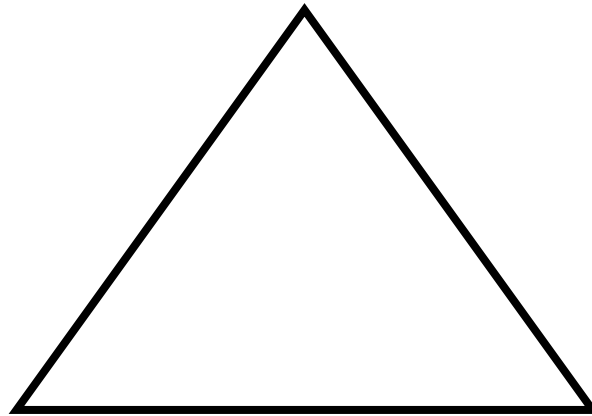


Artikel 25 (1) der REACH-Verordnung:

„In order to avoid unnecessary animal testing, testing on vertebrate animals for the purpose of this Regulation shall be undertaken only as a **last resort**....”

**Gesundheitsschutz
Umweltschutz**



Tierschutz

Ökonomie

Oft geäußerte Vorwürfe gegen konventionelle in vivo-Tests:

Sie seien nicht oder nicht mit der gleichen Stringenz formal validiert worden wie Alternativmethoden

Ihre Prädiktivität sei gering, weil

die Extrapolation von einer Spezies auf die andere unzuverlässig ist (Beispiele aus dem Bereich Kanzerogenität!)

die Extrapolation aus dem hohen in den niedrigen Dosisbereich irreführend sein kann.

Der geringe Erkenntnisgewinn rechtfertige nicht das Leid der verwendeten Tiere

Beispiele für „alternative Methoden“

(RRR: **reduction**, **refinement**, **replacement**)

Acute toxic class method

→ **pattern-based methods (...omics)**

read across, chemical categories

→ **in silico**

→ **in vitro**

ITS: intelligent (integrated) test strategies

„Alternative Testmethoden“

RRR: **reduction**, **refinement**, **replacement**

Acute toxic class method

pattern-based methods (...omics)

read across, chemical categories

→ in silico¹

in vitro

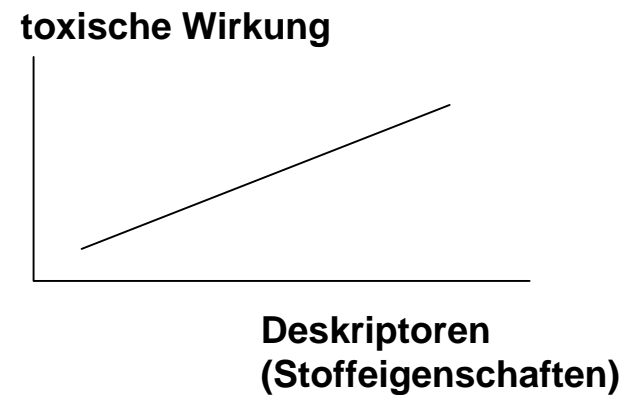
ITS: intelligent (integrated) test strategies

¹ Simon-Hettich et al., Toxicology 224 (2006) 156-162

In silico-Methoden: Computermodellierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

SAR
Expertensysteme
ja / nein

QSAR
statistische Korrelation



Aussichtsreich, wenn

die toxische Wirkung überwiegend auf leicht modellierbare physikochemischen Stoffeigenschaften zurückzuführen ist,
die experimentelle Datenlage gut ist (quantitativ und qualitativ),
der zu prüfende Stoff und die Vergleichsstoffe derselben chemischen Gruppe angehören (domain of applicability)
der betrachtete Endpunkt nicht komplexer Natur ist
der Wirkungsmechanismus bekannt ist

Standarddatenanforderungen unter REACH

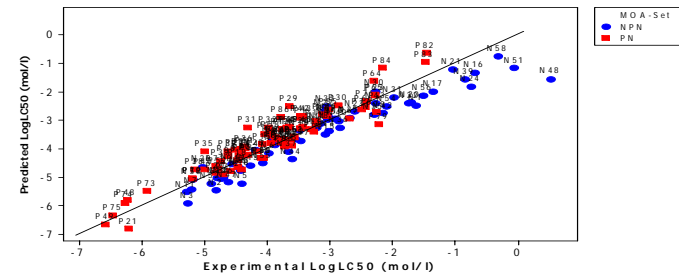
(Waiving-Möglichkeiten nicht aufgeführt)

8.1 Reizung oder Verätzung der Haut	ab 1 t/a
8.2 Reizung der Augen	ab 1 t/a
8.3 Hautsensibilisierung	ab 1 t/a
8.4 Mutagenität	ab 1 t/a
8.5 Akute Toxizität	ab 1 t/a, (10 t/a, wenn ätzend)
8.6.1 28-Tage-Test mit NOAEL	ab 10 t/a
8.6.2 90-Tage-Test mit NOAEL	ab 100 t/a ab 10 t/a bei Verdacht
8.7.1 Screeningtest auf Reprotox	ab 10 t/a
8.7.2 Entwicklungstoxizität	ab 100 t/a
8.7.3 2-Generationentest	ab 100 t/a
8.8 Toxikokinetik	ab 10 t/a
8.9 Kanzerogenität	ab 1000 t/a bei Verdacht

In silico-Methoden: Computermodellierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

SAR
Expertensysteme
→ ja / nein

QSAR
statistische Korrelation



Aussichtreich, wenn

- die toxische Wirkung überwiegend auf leicht modellierbare physikochemischen Stoffeigenschaften zurückzuführen ist,
- die experimentelle Datenlage gut ist (quantitativ und qualitativ),
- der zu prüfende Stoff und die Vergleichsstoffe derselben chemischen Gruppe angehören (domain of applicability)
- der betrachtete Endpunkt nicht komplexer Natur ist
- der Wirkungsmechanismus bekannt ist,
- die Wirkungsmechanismen getrennt voneinander modelliert werden?*

Wie (Q)SARs heute regulatorisch verwendet werden

Zu Priorisierung und Screening

in intelligenten (integrierten) Teststrategien

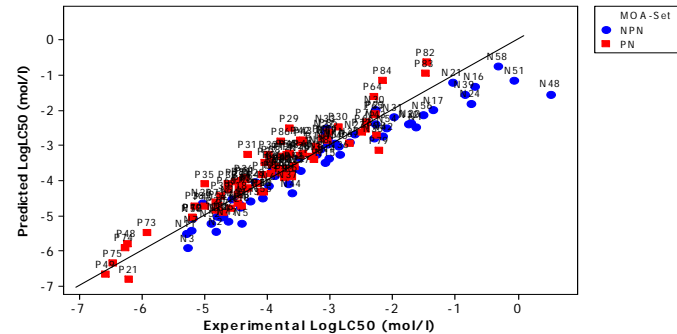
wenn experimentelle Testung nicht möglich

(als ausreichende Datenquelle für einen Endpunkt)

In silico-Methoden: Computermodellierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

SAR
Expertensysteme
→ ja / nein

QSAR
statistische Korrelation



Aussichtreich, wenn

die toxische Wirkung überwiegend auf die physikochemischen Stoffeigenschaften zurückzuführen ist,

die experimentelle Datenlage gut ist (quantitativ und qualitativ),

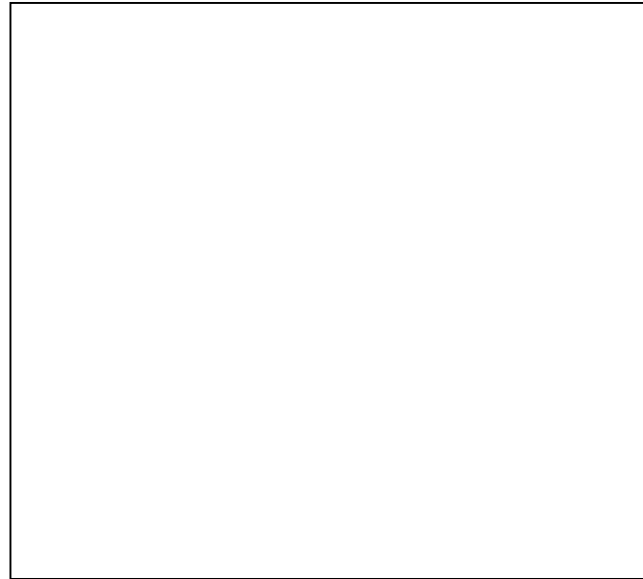
der zu prüfende Stoff und die Vergleichsstoffe derselben chemischen Gruppe angehören (domain of applicability)

der Wirkungsmechanismus bekannt ist,

die Wirkungsmechanismen getrennt voneinander modelliert werden?

Gesundheitsschutz

Wissenschaft



Tierschutz

Ökonomie

„Alternative Testmethoden“

RRR: **reduction**, **refinement**, **replacement**

Acute toxic class method

pattern-based methods (...omics)

ITS: intelligent (integrated) test strategies

in silico¹

→ in vitro

Für *in vitro*-Testmethoden werden im Vergleich zu *in vivo*-Testmethoden folgende Vorteile angeführt:

Sie senken den Tierverbrauch

Sie sind schneller durchführbar

Sie sind besser reproduzierbar

Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aufklärung des Wirkungsmechanismus

Sie erfassen frühe zelluläre Antworten (Entwicklung von Biomarkern?)

Sie senken die Kosten

Überblick über in vitro-Methoden, die für regulatorische Zwecke akzeptiert sind

Toxikologischer Endpunkt

In vitro Methode (No. der OECD Test Guideline)

Dermale Resorption

- Skin Absorption (428)

Phototoxizität

- 3T3 NRU Phototoxicity Test (432)

Hautreizung und -verätzung

- Transcutaneous Electrical Resistance Test (430)
- Human Skin Model test (431)
- Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (435)

Augenreizung

- Embryonated chicken egg (HET-CAM)
- Isolated bovine cornea (BCOP)
- Isolated chicken eye (CEET)
- Isolated rabbit eye (IRE)

Embryotoxizität (pränatale Entwicklung)

- Whole embryo culture (WEC)
- Micromass Test (MM)
- Embryonic stem cell test (EST)

•: OECD Test Guidelines; ○: Tests, die nur in Annex V der Richtlinie 67/548/EEC aufgelistet sind oder nur in einigen EU Mitgliedsstaaten anerkannt werden.

Genotoxizität

- **Bacterial Reverse Mutation Test (471)**
- **Saccharomyces cerevisiae Gene Mutation Assay (480)**
- **Saccharomyces cerevisiae Mitotic Recombination Assay (481)**
- **Mammalian Chromosome Aberration Test (473)**
- **Mammalian Gene Mutation Test (476)**
- **Micronucleus Test (487) (Draft)**
- **Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells (479)**
- **DNA Damage and Repair: UDS in Mammalian Cells (482)**

Karzinogenität

- **Cell Transformation Assays (SHE, Balb/c 3T3, C3H10T1/2)**

●: OECD Test Guidelines; ○: Tests, die nur in Annex V der Richtlinie 67/548/EEC aufgelistet sind oder nur in einigen EU Mitgliedsstaaten anerkannt werden.

Akute Toxizität? (basale Zytotoxizität + ?)

Genotoxizität

- **Bacterial Reverse Mutation Test (471)**
- **Saccharomyces cerevisiae Gene Mutation Assay (480)**
- **Saccharomyces cerevisiae Mitotic Recombination Assay (481)**
- **Mammalian Chromosome Aberration Test (473)**
- **Mammalian Gene Mutation Test (476)**
- **Micronucleus Test (487) (Draft)**
- **Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells (479)**
- **DNA Damage and Repair: UDS in Mammalian Cells (482)**

Karzinogenität

- **Cell Transformation Assays (SHE, Balb/c 3T3, C3H10T)**

●: OECD Test Guidelines; ○: Tests, die nur in Annex V der Richtlinie 67/548/EEC aufgelistet sind oder nur in einigen EU Mitgliedsstaaten anerkannt werden.

Akute Toxizität? (Zytotoxizität +)

(Toxizität nach wiederholter Verabreichung???)

Prieto et al., ATLA 34:315-341 (2006), ECVAM Workshop No.56

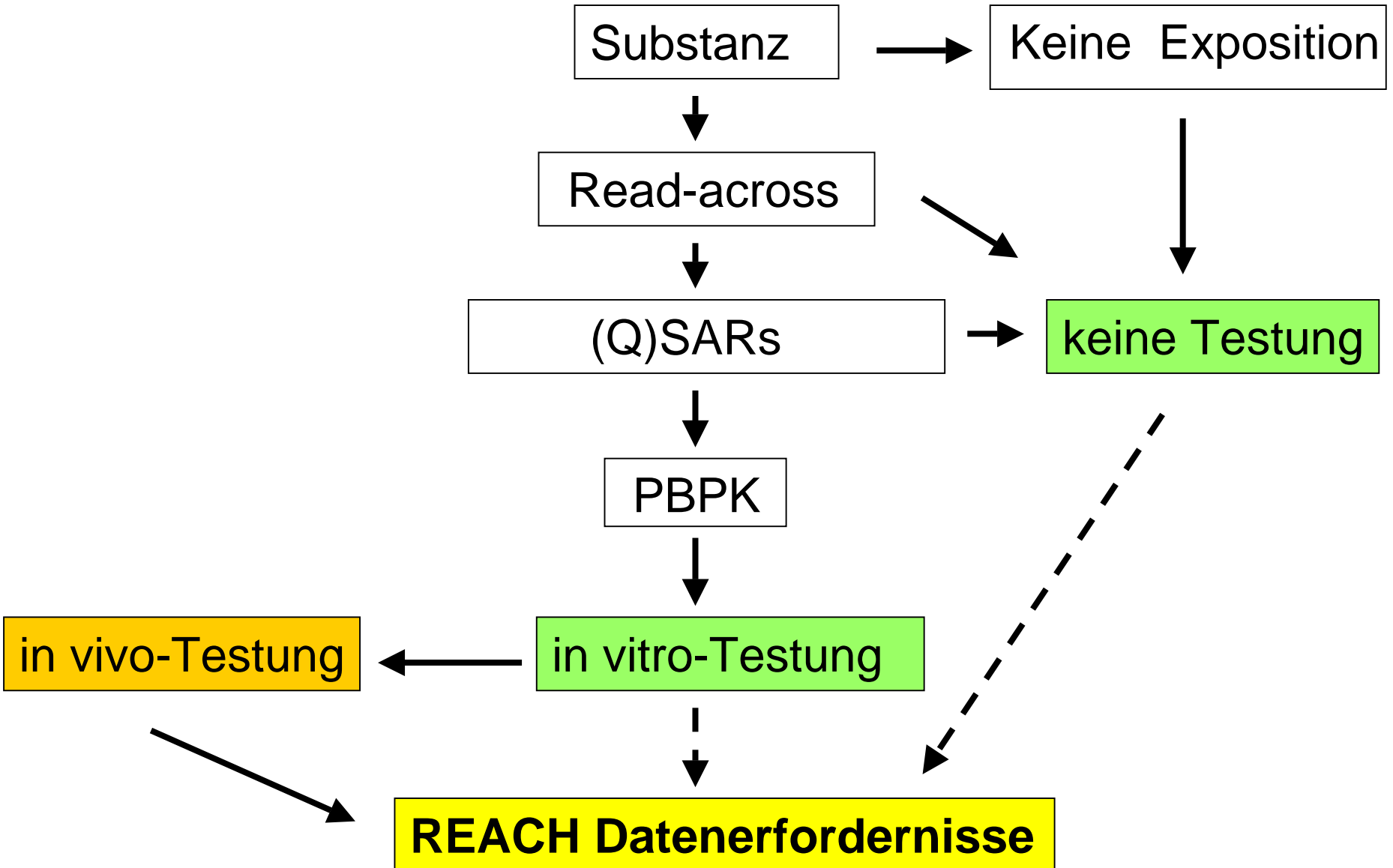
„The major limitations to the use of in vitro models for the assessment of toxicity after repeated dosing are:

1) the lack of suitable in vitro systems to mimic all the possible **interactions** which may result in vivo

2) the limited possibilities of using cell culture systems to account for **kinetics and biotransformation**

3) the difficulty to derive from in vitro systems values such as the **NOAELs**, which are traditionally used as the starting point for risk assessment.“

Integrierte Teststrategien unter REACH

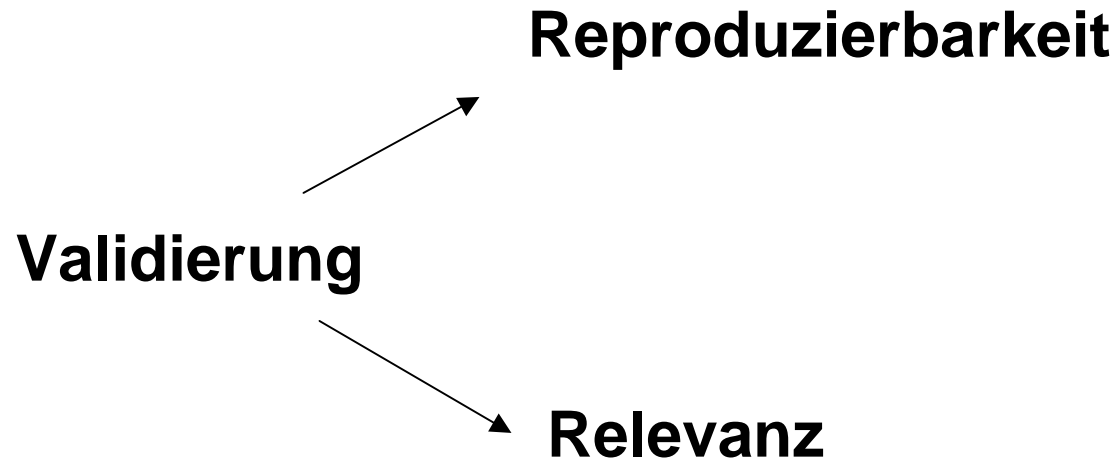


EU-gesponsorte Verbundprojekte zur Entwicklung von *in vitro*-Testmethoden

Akute Toxizität: ACuteTox
www.acutetox.org

Reproduktionstoxizität: ReProTect
www.reprotect.eu

Haut- und Atemwegssensibilisierung: Sens-it-iv
www.sens-it-iv.eu



**Zeit bis zur wissenschaftlichen Akzeptanz:
mehrere Jahre**

**Zeit bis zur regulatorischen Akzeptanz:
zusätzlich mehrere Jahre**

Current developments of in vitro tests according to an expert group on behalf of the EU Commission. Status at the end of 2003 (according to Eskes and Zuang, 2005)

Health effect	scientific acceptance	Estimated time to achieve full replacement ¹
Subacute and subchronic toxicity	> 10 years	Not estimated ²
Carcinogenicity	5 years (optimised tests) > 10 years (tests under R&D)	Not estimated ²
Reproductive and developmental toxicity	6 and >10 years for tests under (pre)validation and R&D, resp.	Not estimated ²

¹ Regulatory acceptance at the EU level

² The experts assessed the time required for full replacement of animal tests to be probably much longer than 10 years.

Eskes and Zuang (2005): Akzeptanz-Voraussage für Alternativmethoden (Status 2004)

wissenschaftlich

regulatorisch (EU)

Embryotoxizität

2008

Kanzerogenität (optimiert)

2009

Hautsensibilisierung (in silico)

2010

Reproduktionstoxizität (prävalidiert)

2011

2012

2013

2014

Subakute/subchronische Toxizität

.....

2015

2016

.....

Hautsensibilisierung

2017

2018

???

Subakute/subchronische Toxizität

Kanzerogenität

Reproduktionstoxizität

- 1. Der Zeitrahmen von REACH ist zu eng, als dass die Entwicklung von Alternativmethoden den Einsatz von Wirbeltierversuchen in den Mengenbändern oberhalb von 100 t/a wesentlich vermindern könnte.**

Wir warnen davor, diesem Dilemma durch Einsatz unausgereifter Alternativmethoden zu begegnen.

Wir vertreten die Auffassung, dass eine Fall-zu-Fall-Betrachtung bis zur Verfügbarkeit ausgereifter alternativer Teststrategien weiterhin der angemessene Weg der Sicherheitsbewertung von Chemikalien ist.

2. Bisher existiert nur für in vitro-Methoden eine erprobte Validierungsstrategie.

Wir halten es für vordringlich, dass die Entwicklung und Erprobung von Validierungsmethoden für die übrigen Klassen von Alternativmethoden beschleunigt vorangetrieben wird.

3. Wir sind zuversichtlich, dass im REACH-Verfahren große Datenmengen von guter Qualität anfallen werden, sofern geeignete Mechanismen zur Sicherung der Datenqualität implementiert werden.

Wir fordern die zeitnahe Etablierung von Datenbanken, über die dieses Datenmaterial von der Wissenschaft für die Weiterentwicklung von alternativen Methoden genutzt werden kann

4. Die Bereitstellung der Daten für die Registrierung unter REACH, die Festlegung von Validierungsstrategien, der Aufbau von toxikologischen Datenbanken und die Weiterentwicklung von Alternativmethoden setzen die Verfügbarkeit von toxikologischer Expertise voraus.

Wir fordern die Sicherstellung und Ausweitung der Ausbildung von Toxikologen und Toxikologinnen an den Universitäten

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!