

# Verlag

## **Quick & Dirty: Hoe sneller en meer gegevens over toxiciteit van stoffen genereren?**

Verlag bijeenkomst van de sectie Arbeidstoxicologie van de NVT en de Contactgroep Gezondheid en Chemie (CGC), gehouden op 12 maart 2015 te Den Bosch

*Nicole Palmen<sup>1</sup> en Fenneke Linker<sup>2</sup>*

Het afleiden van grenswaarden voor stoffen in het beroep gaat te langzaam; dat was de uitkomst van het symposium dat de NVT-AT op 25 september 2014 organiseerde. Recente ontwikkelingen in de toxicologie bieden de

mogelijkheid dat de risicobeoordeling sneller, effectiever en met minder dierproeven kan. Met behulp van deze zogenaamde Intelligent Testing Strategies integreert men kennis en gegevens over de chemische structuur

<sup>1</sup> RIVM, Centrum Veiligheid van Stoffen en Producten, senior onderzoeker, toxicoloog/ arbeidshygiënist

<sup>2</sup> DSM Expert Center, senior toxicoloog/arbeidshygiënist

(computational chemistry), de kinetiek, de stofwisseling, systeembioogie, -omics data en gegevens over de toxiciteit van een stof. Een aantrekkelijk toekomstbeeld, maar hoe ver zijn we hierin eigenlijk, en hoe betrouwbaar zijn de nieuwe methoden? Kunnen ze de huidige risico-beoordeling al vervangen?

Programma

- Dinant Kroese: DIAMONDS project: de verschillende systemen/modellen waarmee inzicht in de toxiciteit van data-poor substances kan worden verkregen
- Danyel Jennen: Toxicogenomics; toepasbaarheid van deze methodieken voor de praktijk
- Aldert Piersma: Innovatieve teststrategieën in reproductie- en ontwikkelings toxiciteit
- Fenneke Linker: Het afleiden van grenswaarden in de praktijk

### **Dinant Kroese (TNO): DIAMONDS project: de verschillende systemen/modellen waarmee inzicht in de toxiciteit van data-poor substances kan worden verkregen**

Bij TNO wordt gewerkt aan een software platform (DIAMONDS) om voor stoffen, die nog niet volledig getest zijn, de potentieel gezondheidsbedreigende eigenschappen te kunnen voorspellen. Dinant Kroese zette uiteen hoe de voorspellingen op basis van molecuulstructuur uitgevoerd worden, gevolgd door een biologische verificatie stap (*in vitro* – veelal omics technologie). DIAMONDS richt zich nu op de complexe eindpunten ontwikkelings toxiciteit en repeated dose toxiciteit.

Het is de bedoeling om bijvoorbeeld voor de REACH dossiers via deze systematiek nog openstaande eindpunten goed onderbouwd in te kunnen vullen, waarmee het aantal dierproeven kan worden beperkt en een snelle en goedkope oplossing gevonden wordt. Maar deze aanpak kan ook ingezet worden ten behoeve van safe design activiteiten.

In DIAMONDS wordt kennis gecombineerd uit de domeinen computational chemistry, kinetics/PBPK, omics/systems biology/bioinformatics en toxicology, tegen de achtergrond van het Adverse Outcome Pathway concept. Allereerst wordt gezocht naar structuur-gerelateerde stoffen met de gezochte toxiciteitsdata, om een read across case te bouwen (similarity tooling).

Indien er geen geschikte stoffen zijn voor read across, is een volgende optie om naar onderdelen van de molecuulstructuur te kijken en de relatie daarvan met een bepaald biologisch effect.

Het applicatiedomein van DIAMONDS betreft organische stoffen; de methodiek werkt - o.a. door gebrek aan achtergrondinformatie - voornamelijk niet voor metalen, nanodeeltjes en chemische mengsels. Het is wel het plan DIAMONDS ook naar deze domeinen uit te breiden.

Als voorbeeld wordt een read across case van valproïne analoge en ontwikkelings toxiciteit besproken (Kroese *et al*, *in press*)

### **Danyel Jennen (Universiteit Maastricht): Toxicogenomics; toepasbaarheid van deze methodieken voor de praktijk**

Bioinformaticus Danyel Jennen gaf een overzicht van verschillende toxicogenomics projecten waarbij met behulp van *in vitro* en *in vivo* predictiemodellen kan worden voorspeld of een stof een genotoxisch werkingsmechanisme heeft of niet. Door het gebruik van deze technieken kan het aantal dierproeven behoorlijk worden teruggebracht. Het principe van een op transcriptomics gebaseerd assay voor het onderscheid tussen genotoxische en niet genotoxische stoffen, is het verschil in up- en downregulatie van een aantal genen (i.e. productie van mRNA). Door een onbekende stof met behulp van deze methodiek te testen, en te vergelijken met de 'output' van genotoxische en niet-genotoxische stoffen, kan een inschatting van de genotoxische potentie van die nieuwe stof worden gemaakt.

De onderzoeksopzet is als volgt:

- 1) hepatocyten *in vitro* incuberen met een stof,
- 2) de genexpressie meten,
- 3) de kans op genotoxiciteit van deze stof voorspellen.

Momenteel zijn op deze manier 62 stoffen getest (Magkoufopoulou *et al*, 2012).

Verder zijn op eenzelfde wijze 31 pesticiden getest om de *in vivo* genotoxiciteit te voorspellen. Hierbij bleek de voorspelling door middel van transcriptomics hoog te scoren. Deze bleek een stuk hoger dan de voorspelling op basis van een Ames test.

Door middel van data-integratie van klinische chemie en transcriptomics gevolgd door clustering, kunnen stoffen waarvan de 2D structuur hetzelfde is, mogelijk beter gegroepeerd worden. De gebruikte methode biedt opties voor toepassingen in read-across.

### **Aldert Piersma (RIVM) Innovatieve teststrategieën in reproductie- en ontwikkelings toxiciteit**

Na de pauze volgden twee meer toegepaste verhalen. Aldert Piersma behandelde geïntegreerde teststrategieën voor reproductietoxiciteit (Piersma, 2013). De reproductiecyclus kan worden ingedeeld in 3 fases, te weten de fertiliteit, de prenatale ontwikkeling en de postnatale ontwikkeling. Ten aanzien van de eerste twee groepen wordt het meeste onderzoek verricht. Momenteel kost reproductietoxiciteitsonderzoek nog altijd zeer veel proefdieren als gevolg van meerdere generaties in één studie. Dit kan worden verminderd door efficiënte inzet van testen als cellijnen, primaire celculturen, orgaan- en embryonale culturen. Het zal echter altijd noodzakelijk zijn een combinatie van testen in te zetten. Tijdens de presentatie werden een drietal alternatieve methoden bediscussieerd: embryonale stamcellen, zeebravis embryo's en ratte embryo's. Bij de embryonale stamceltest proliferereert de cel in eerste instantie, waarna differentiatie naar een hartcel volgt. Tijdens dat proces wordt de genexpressie gevolgd en zie je tijdafhankelijke up- en downregulatie van mRNA. In eerste instantie zijn met name genen actief die voor proliferatie zorgen, maar naar

mate de tijd verstrijkt worden genen die verantwoordelijk zijn voor de differentiatie naar een hartcel actief. Door nu embryonale stamcellen te incuberen met een stof, is het mogelijk om na te gaan of die stof meer of minder effect heeft op de proliferatie en/of de differentiatie van de cel. Bekende reprotoxische stoffen beïnvloeden de differentiatie van de pluripotente stamcel naar de hartcel. Incubatie van stamcellen met flusilazole laat met behulp van deze methodiek al effecten zien bij concentraties waarbij nog geen sprake is van celtotoxiciteit. Op deze wijze kunnen dus vroege reprotoxische effecten van een stof worden opgespoord, waarbij nog geen celschade zichtbaar is. Ook bij de zeebravis embryotoxiciteitstest wordt de genexpressie gevolgd in de tijd en worden op dit niveau al veranderingen gezien na incubatie met flusilazole, zonder dat bij de zeebravis een afwijking wordt geconstateerd. De ratteembryokweek werd op dag 10-12 geïncubeerd met retinolzuur, en ook hier werden retinolzuur afhankelijke genen beïnvloed. De vraag is nu in hoeverre we toxische effecten van stoffen kunnen voorspellen met behulp van deze testen. Voor de ontwikkelingstoxicologie is dat veel moeilijker dan voor allergische contact dermatitis, omdat het achterliggende mechanisme veel ingewikkelder is. Wel is duidelijk dat retinolzuur een sleutelrol speelt in het sturen van de differentiatie van pluripotente stamcellen. Met name de balans tussen retinolzuur en groeifactoren bepaalt de mate van differentiatie van een weefsel. In de toekomst kan deze methodiek wellicht gebruikt gaan worden bij het afleiden van een grenswaarde. Hiervoor is het nodig de overall toxische potentie van een stof te destilleren uit een toxiciteitsprofiel dat is gebaseerd op een aantal relevante adverse outcome pathways, die worden getest met een aantal wel overwogen testen. De vraag uit de zaal of dit type *in vitro* testen het testen van een 2<sup>e</sup> species overbodig maakt werd negatief beantwoord. Dit ligt niet zozeer aan het feit dat een extra species wordt getest, maar meer omdat het aantal waarnemingen de betrouwbaarheid vergroot.

### **Fenneke Linker (DSM) Het afleiden van grenswaarden in de praktijk**

Vervolgens werd door Fenneke Linker, uiteengezet hoe in de praktijk veilige grenswaarden worden afgeleid, ook als er weinig testgegevens beschikbaar zijn. Als er data beschikbaar is, zijn de stappen overzichtelijk: data verzamelen, kritisch effect vaststellen, veiligheidsfactoren kiezen, en het maken van de afweging met betrekking tot huid als blootstellingsroute. Als er geen (repeated dose) testen beschikbaar zijn, maar er is wel een LD50 (rat, oraal) bepaald en er is géén indicatie voor CMR eigenschappen, kan de MTD methode worden toegepast om de maximum tolerated dose te bepalen – de dosis waarbij minimale toxiciteit verwacht wordt (ECETOC, 2006). Op basis van de MTD kan dan met (geadviseerde) assessment factoren een grenswaarde afgeleid worden. Een andere methode is read across, als er vergelijkbare stoffen (molecuulstructuur, verwachte metabolieten) beschikbaar zijn die wél voldoende data hebben.

Verder kan ook control-banding worden toegepast; op basis van wél bekende eigenschappen van een stof, de stof indelen in een health hazard band en een daarbij horende (conservatieve) grenswaarde bepalen.

De QSAR toolbox (OECD toolbox) is een praktisch software pakket, waarmee op basis van een molecuulstructuur een alert profiel opgesteld kan worden, maar ook naar beschikbare testgegevens gezocht kan worden en een vergelijking met data van andere stoffen mogelijk is. De voorspelling van eindpunten met deze tool behoort ook tot de mogelijkheden, maar de juistheid van de voorspelling hangt zeer nauw samen met de gekozen stoffen met data.

In de praktijk is het afleiden van grenswaarden voor stoffen met weinig testdata vaak een combinatie van benaderingen; en hangt het van het stof profiel af wat de beste methode is.

### **Discussie**

Na afloop volgde een plenaire discussie. Op de vraag of de gepresenteerde innovatieve methodieken door de regelgeving zijn geaccepteerd werd negatief geantwoord. In het kader van REACH zal case by case bekeken moeten worden of structurele overeenkomsten van moleculen of *in vitro* testen kunnen worden opgevoerd in het dossier. De methodieken kunnen wel gebruikt worden om stoffen te groeperen. Het afleiden van grenswaarden betreft veelal omgaan met onzekerheden: autoriteiten zijn in de regel conservatiever dan de industrie.

Als uitsmijter werd door voorzitter Jeroen Terwoert nog een mooi statement gemaakt:

Quick: de noeste arbeid van de onderzoekers levert zeker niet snel uitkomsten op

Dirty: de resultaten zijn minder 'dirty' dan gedacht.

### **Literatuur**

- ECETOC (2006), Guidance for Setting Occupational Exposure Limits: Emphasis on Data-Poor Substances, ECETOC TR 101 (2006); appendix D: Prediction of an oral MTD from a LD50 and a Log Kow
- Kroese et al, Reproductive Toxicology, *in press*
- Magkoufopoulou, C. et. al (2012) A transcriptomics-based *in vitro* assay for predicting chemical genotoxicity *in vivo*, Carcinogenesis, vol 33, no 7: 1421-1429
- Piersma A.H. et. al (2013) Evaluation of an alternative *in vitro* test battery for detecting reproductive toxicants. Reproductive Toxicology 38; 53-64