

Institut für Ernährungswissenschaft
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kleuser

**Computergestützte Analysen in der Toxikologie
Anwendung von In-silico-Modellen und Nutzen in der
Risikobewertung**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat)
in der Wissenschaftsdisziplin
„Toxikologie und Pharmakologie“**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Falko Partosch**

Potsdam, den 28. September 2015

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-82334

<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-82334>

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XII
Summary	XV
1. Einleitung: <i>In-silico</i>-Toxikologie	1
2. Erstellung ELINCS-Datenbank	5
2.1. Einleitung	5
2.1.1. Geschichte und Grundlagen	5
2.1.2. Ausnahmen und Schwierigkeiten bei der Wirkungsbestimmung .	6
2.1.3. Spezielle Fragestellungen im regulatorischen Umfeld	9
2.1.3.1. Anforderungen der Europäischen Chemikaliengesetzge-	
bung	10
2.1.3.2. QSAR und Einschränkungen von Tierversuchen unter	
REACH	11
2.1.4. Bedarf an QSAR	13
2.1.5. Weitere Anwendungsmöglichkeiten von QSAR	14
2.1.6. Geforderte Eigenschaften eines QSAR-Tools	15
2.1.7. Weitere QSAR-Betrachtungen unter REACH in der EU	16
2.1.8. Entwicklungsstand	17
2.1.9. QSAR in der Zukunft	18
2.1.10. Vorhersage toxikologischer Eigenschaften und Eingruppierungen	19
2.2. Material und Methoden	20
2.2.1. Neustoff-Datenbank	20
2.2.2. RepDose-Datenbank	22
2.2.2.1. Allgemeines	22

2.2.2.2.	Implementierung der Datenbank	22
2.2.2.3.	Bisherige Arbeiten am Datensatz	22
2.2.3.	Vergleich der Datenbanken	23
2.2.4.	Anpassung der Datenbanken	23
2.2.5.	Zusammenhang physikochemische Parameter und Toxizität . . .	24
2.3.	Ergebnisse und Diskussion	25
2.3.1.	Allgemeine Ergebnisse der Neustoff-Datenbank	25
2.3.2.	Effekte der sensitivsten Organe	28
2.3.3.	Vergleich zwischen RepDose und Neustoff-DB	38
2.3.3.1.	Studien-Vergleiche	38
2.3.3.2.	Physikochemische Daten	45
2.3.3.3.	Effect Levels	48
2.3.3.4.	Zusammenhang physikochemische Parameter und Toxizität	50
3.	Risikoabschätzung ohne substanzspezifische toxikologische Daten - das TTC-Konzept	53
3.1.	Einleitung	53
3.1.1.	Geschichte des TTC	53
3.1.2.	Weitere Arbeiten und Datenbanken mit TTC	56
3.1.3.	TTC in der Regulatorik	57
3.1.4.	Ermittlung der TTC-Werte	57
3.1.5.	Cramer-Klassen	58
3.1.6.	Internes TTC-Konzept	59
3.2.	Methoden	60
3.2.1.	Eingesetzte Software	60
3.2.1.1.	Toxtree	60
3.2.1.2.	ACD Percepta	61
3.2.1.3.	OpenBabel	62
3.2.2.	Datenbanken	62
3.2.2.1.	ELINCS	62
3.2.2.2.	Munro	63
3.2.2.3.	FCM	63
3.2.3.	Berechnung des internen NOAELs	64
3.2.4.	Cramer-Klassifikation	64
3.2.5.	Bestimmung des TTC	64
3.2.6.	Unsicherheitsanalyse	67

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

Inhaltsverzeichnis

3.3. Ergebnisse	68
3.3.1. Errechnete Bioverfügbarkeiten	68
3.3.2. TTC-Werte der Datenbanken	68
3.3.2.1. Munro-Datenbank	69
3.3.2.2. ELINCS-Datenbank	69
3.3.2.3. FCM-Datenbank	69
3.3.3. Gesamtdatensatz	71
3.4. Diskussion	71
4. Kinetik	78
4.1. Physiologisch basiertes kinetisches Modelling	78
4.2. Alkohol	79
4.2.1. Einleitung	79
4.2.2. Methoden und Ergebnisse	83
4.2.3. Diskussion	94
4.3. Polymorphismen Bisphenol-A-metabolisierender Enzyme	96
4.3.1. Einleitung	96
4.3.2. Methoden	100
4.3.3. Ergebnisse	102
4.3.3.1. Blutkonzentrationen unter Berücksichtigung der K_m - und V_{max} -Werte der 15 humanen Lebern	102
4.3.3.2. Blutkonzentrationen unter Berücksichtigung der K_m - und V_{max} -Werte aus <i>In-vitro</i> -Studien: Wildtyp gegen- über UGT2B15.2 und UGT2B15.5	103
4.3.3.3. Relative Anteile der Glucuronidierung und Sulfatierung an der BPA-Exkretion	106
4.3.4. Diskussion	107
5. Diskussion	110
Literaturverzeichnis	116
A. Anhang	i
Eidesstattliche Erklärung	ix

Abbildungsverzeichnis

1.1. Schlagworte bei PubMed	3
2.1. Morphin und dessen Derivate	7
2.2. Indinavir und Vorläufer	7
2.3. Enalkiren und Modifikation	8
2.4. Nalidixinsäure	9
2.5. Chinolon SAR	10
2.6. Diagramm Verteilung aller Effekte in den Organen	27
2.7. Effekte klinische Chemie	30
2.8. Effekte klinische Symptome	32
2.9. Effekte auf die Leber	34
2.10. Effekte auf die Niere	36
2.11. Enzymaktivität der Leber	37
2.12. Absoluter Vergleich der Zielorgane	43
2.13. Relativer Vergleich der Zielorgane	44
2.14. Vergleich Molekulargewicht	45
2.15. Vergleich Dampfdruck	46
2.16. Vergleich Löslichkeit	47
2.17. Vergleich logP	48
2.18. Vergleich NOEL	49
2.19. Vergleich LOEL	50
2.20. Zusammenhang Molekulargewicht und Toxizität	51
2.21. Zusammenhang logP und Toxizität	52
3.1. Aufteilung Cramer-Klassen	65
3.2. Verteilungsfunktionen der Datenbanken	66
3.3. Berechnete Bioverfügbarkeiten der Datenbanken	68
3.4. Empirische Verteilung NOAELs	72
3.5. Empirische Verteilungen der NOAELs im Gesamtdatensatz	73
3.6. Aufbau des Unsicherheitsfaktors	75
4.1. Struktur des Modells einer stillenden Mutter und ihres Kindes	85

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

Abbildungsverzeichnis

4.2. Struktur des Modells einer schwangeren Mutter und des Feten.	88
4.3. Simulierte Alkohol-Konzentrationen in Mutter und Neugeborenem . . .	90
4.4. Simulierte Alkohol-Konzentrationen in Mutter und 3 Monate altem Säug- ling	91
4.5. Simulierte Alkohol-Konzentrationen in Mutter und Fetus	92
4.6. Struktur von Bisphenol A	98
4.7. Verteilung UGT-Isoenzyme	99
4.8. BPA-Clearance	100
4.9. PBPK-Modell	101
4.10. Simulierte BPA-Konzentrationen	104
4.11. Simulierte BPA-Werte der UGT2B15-Varianten	105
4.12. Verhältnis Glucuronidierung zu Sulfatierung	107
5.1. TTC-Konzept	113

Tabellenverzeichnis

2.1. REACH-Anforderungen Toxizität	12
2.2. Ländercodes ELINCS	20
2.3. Zusammenfassung Endpunkte	24
2.4. Häufigkeiten der Effekte in Organen	26
2.5. Häufigkeit Verabreichungswege	28
2.6. Effekte klinische Chemie	29
2.7. Effekte klinische Symptome	31
2.8. Effekte Leber	33
2.9. Effekte Niere	35
2.10. Enzymaktivität	36
2.11. Referenzwerte Enzyme	37
2.12. Studiendauer beider Datenbanken	39
2.13. Studienübersicht beider Datenbanken	40
3.1. Datensatz von Frawley	55
3.2. TTC-Werte (5. Perzentil) der Datenbanken getrennt	70
3.3. TTC-Werte (10. Perzentil) der Datenbanken getrennt	70
3.4. interne TTC-Werte aller Datenbanken	71
3.5. Aufteilung Cramer-Klassen	76
4.1. Anatomische und physiologische Daten	82
4.2. Trinkszenarien Mutter	83
4.3. Stillszenarien	84
4.4. Dosierung Carminativum Hetterich	84
4.5. Alkoholkonzentrationen im Blut	93
4.6. Modellparameter	102
4.7. Simulierte BPA-Werte nach Kuester und Sipes	103
4.8. Simulierte BPA-Werte der UGT2B15-Varianten	105
4.9. Prozentangaben der Dosen, die glucuronidiert und sulfatiert werden . .	106

Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

ACD Advanced Chemistry Development, Inc.

ADH Alkoholdehydrogenase

ADI Acceptable Daily Intake

ADME Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination

ALAT Alanin-Aminotransferase

AOP Adverse Outcome Pathways

AP Alkalische Phosphatase

ASAT Aspartat-Aminotransferase

AUC Area under the curve

BAuA Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

BfR Bundesinstitut für Risikobewertung

BIBRA British Industrial Biological Research Association

BPA Bisphenol A

BV Bioverfügbarkeit

bw body weight

CAS Chemical Abstracts Service

CEFIC Conseil Européen de l'Industrie Chimique - Verband der Europäischen chemischen Industrie

ChE Cholinesterase

- ChemG** Chemikaliengesetz (Deutschland)
- Cl_{int}** intrinsische Clearance
- C_{max}** Spitzenkonzentration
- CMR** Cancerogen, Mutagen, Reproduktionstoxisch
- COLIPA** European Cosmetics Toiletry and Perfumery Association
- CPDB** Carcinogenic Potency Database
- CYP** Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
- DART** Developmental And Reproductive Toxicity
- DB** Datenbank
- EC** European Commission
- ECETOC** European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
- ECHA** European Chemicals Agency
- ECOPA** European Consensus Platform on Alternatives
- EDV** Elektronische Daten-Verarbeitung
- EEC** European Economic Community
- EFSA** European Food Safety Authority
- EG** Europäische Gemeinschaft
- EINECS** European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances
- ELINCS** European List of Notified Chemical Substances
- EMA** European Medicines Agency
- EPA** (US) Environmental Protection Agency
- EU** Europäische Union
- FAO** Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FCM** Food Contact Materials

FDA (US) Food and Drug Administration

fu fraction unbound

GefStoffV Gefahrstoffverordnung

GGT γ -Glutamyltransferase

GHS Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals

HIV Humanes Immundefizienz-Virus

HSA Humanes Serumalbumin

IFCC International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

IRIS Integrated Risk Information System

ITEM (Fraunhofer) Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

JRC Joint Research Center

KG Körpergewicht

K_m Michaeliskonstante

LDH Lactat-Dehydrogenase

LOAEL Lowest Observed Adverse Effect Level

LOEL Lowest Observed Effect Level

LRI Long-range Research Initiative

MA Membrane Affinity

MoA Mode of Action

MOL MDL Molfile

NOAEL No Observed Adverse Effect Level

NOEL No Observed Effect Level

- NTP** National Toxicology Program
- OECD** Organisation for Economic Co-operation and Development
- PBT** Persistierend, Bioakkumulativ, Toxisch
- PBTK** Physiologisch Basiert ToxikoKinetisch
- PBPK** Physiologisch Basiert PharmakoKinetisch
- PC** Physikalisch-Chemisch
- QSAR** Quantitative Structure Activity Relationship
- REACH** Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
- RepDose** Repeated Dose
- SAR** Structure Activity Relationship
- SCF** Scientific Committee on Food
- SMILES** Simplified Molecular Input Line Entry Specification
- SML** Specific Migration Limit
- SULT** Sulfotransferase
- Tab.** Tabelle
- TDI** Tolerable Daily Intake
- TG** Test Guideline
- Tox** Toxizität
- Toxbase** Toxicity Database
- ToxRef** Toxicity Reference
- TTC** Threshold of Toxicological Concern
- UDP** Uridindiphosphat
- UGT** UDP-Glucuronyltransferase
- URL** Uniform Resource Locator

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

Abkürzungsverzeichnis

USA United States of America

V_{max} maximale Reaktionsgeschwindigkeit

vPvB very persistent and very bioaccumulative

WHO World Health Organization

XPS Expertensystem

Zusammenfassung

In der Toxikologie sind Tierversuche gängige Methoden zur Bestimmung des toxischen Potentials von Substanzen. Alternativmethoden zum Tierversuch haben in den letzten Jahren, insbesondere im Rahmen der EU-weiten REACH-Verordnung, an Bedeutung gewonnen. Die Alternativmethoden gliedern sich auf in *In-vitro*- und *In-silico*-Methoden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Konzepte der *In-silico*-Toxikologie behandelt, um einen Überblick über die Bandbreite der Anwendungsmöglichkeiten computergestützter Berechnungen in der Toxikologie zu erzeugen. Denn obwohl die Entwicklung der *In-silico*-Toxikologie noch am Anfang steht, können hier seit einigen Jahren Fortschritte verzeichnet werden, die diesen Methoden Tore zu verschiedenen Bereichen der Toxikologie öffnen.

Die in dieser Dissertation bearbeiteten Themen reichen von quantitativen Strukturaktivitätsbeziehungen (QSAR) über eine neue Herangehensweise an das gängige TTC-Konzept bis hin zu Modellierungen zum Alkohol- und Bisphenol-A-Metabolismus.

Das Kapitel über QSAR befasst sich im Wesentlichen mit der Erstellung und Analyse einer Datenbank des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) mit Studien nach wiederholter Gabe von 28 und 90 Tagen Dauer mit insgesamt 878 Substanzen in 896 Studien. Das Design der Datenbank wurde dabei dem Design einer schon bestehenden Datenbank des Fraunhofer ITEM aus Hannover angepasst, der RepDose-Datenbank, in der 622 Stoffe in 1877 Studien erfasst sind. Durch diese Vorgehensweise konnte ein vergleichsweise großer Datenpool erzeugt werden, der für weitergehende Analysen zur Verfügung stand. Für die Stoffe in beiden Datenbanken zeigte sich, dass die physikochemischen Eigenschaften mit den toxischen Wirkungen der Stoffe recht gut übereinstimmen. Zudem zeigte sich, dass Stoffe mit geringerem Molekulargewicht ein erhöhtes Potential für toxikologisch relevante Schäden aufwiesen, als größere Moleküle.

Das TTC-Konzept erlaubt dem Anwender Grenzwerte für Stoffe geringer Exposition zu erzeugen, zu denen keine toxikologischen Daten zur Verfügung stehen. Unter Verwendung von Studien-NOELs strukturell verwandter Stoffe ist es möglich, einen Wert zu bestimmen, unterhalb dessen das Risiko adverser Effekte sehr gering und damit akzeptabel ist. Eine gängige Vorgehensweise zur Erzeugung von Datenpools ähnlicher Stoffe ist die Klassifizierung der Stoffe nach Cramer. Bei der Cramer-Klassifizierung

werden Stoffe anhand ihrer Struktur in die Kategorien „nicht toxisch“, „möglicherweise toxisch“ und „wahrscheinlich“ bzw. „eindeutig toxisch“ eingeteilt. Für jede der drei Klassen werden dabei Grenzwerte ermittelt. Je nachdem, in welche Kategorie eine unbekannte Substanz eingeordnet wird, gilt für sie der entsprechende Grenzwert. In dieser Arbeit wurde ein großer Datenpool erzeugt, indem mehrere Datenbanken zusammengelegt wurden. Dies sind im einzelnen die ELINCS-Datenbank, die Munro-Datenbank und eine, die sogenannte *food contact materials* enthält. Das klassische TTC-Konzept basiert also auf den NOELs bekannter Stoffe. Eine neue Herangehensweise dieser Arbeit war die Bestimmung von internen NOELs und damit auch die Bestimmung interner TTC-Werte. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, den Expositionsweg herauszurechnen und ermittelte Grenzwerte für orale Exposition etwa auch auf Stoffe anzuwenden, die dermal aufgenommen werden. Unter Anwendung einer Software, die die Bioverfügbarkeit aller Stoffe ermitteln kann, wurden somit die internen NOELs errechnet. Diese Arbeit befasste sich außerdem mit einer weiteren Schwierigkeit von TTC-Werten. Da die gängige Methode der Cramer-Klassifizierung die Zuteilung zu den Klassen sehr konservativ betreibt, werden kaum Stoffe der zweiten Klasse zugeordnet. Tatsächlich werden die meisten Stoffe (> 78 %) der dritten Klasse zugeordnet und gelten nach Cramer daher als „eindeutig toxisch“. Aus diesem Grund wurden hier die Stoffe der zweiten und dritten Klasse zusammengelegt. In der Auswertung zeigte sich, wie zu erwarten, dass die internen TTC-Werte geringer als die normalen „externen“ waren. Interne TTC-Werte könnten im regulatorischen Umfeld dazu genutzt werden, auf einige Tests, wie Tierversuchsstudien mit wiederholter Gabe, zu verzichten. Stoffe, deren interne Exposition unterhalb der ermittelten internen TTC-Werte liegen, könnten gemäß der REACH-Verordnung als ‘*no relevant human exposure*’ oder ‘*no significant exposure*’ deklariert werden, wodurch Tierversuche eingespart werden könnten.

Physiologisch basiertes kinetisches Modellierung wird genutzt, um physiologische Vorgänge im menschlichen Körper zu simulieren und dadurch kinetische Prozesse nachvollziehen zu können. Als Ergebnis können Expositionen von Chemikalien nach Aufnahme in den Körper simuliert werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Stoffe in physiologischen Modellen untersucht. Bei der Kinetik von Alkohol wurde versucht, Alkoholexpositionen von gestillten Neugeborenen zu simulieren, wenn die stillende Mutter zuvor verschiedene alkoholische Getränke zu sich genommen hatte. Anlass sind unklare und teilweise widersprüchliche Empfehlungen für Mütter, die Alkohol konsumieren. In dem Modell konnte gezeigt werden, dass die Exposition des Kindes durchweg gering war, wenn die Mutter zuvor Alkohol zu sich genommen hatte. Die Spitzenkonzentrationen lagen bei 0,0034 ‰ bei einem Neugeborenen und 0,0039 ‰ bei einem 3 Monate alten Säugling, nach Konsum von einem Glas Wein (0,25 l) unmittelbar vor Beginn

des Stillens. Zum Vergleich wurde die Exposition durch ein ohne Begrenzung der Anwendungsdauer zugelassenes alkoholhaltiges pflanzliches Arzneimittel zur Behandlung von Blähungen im Säuglingsalter simuliert. Es ergaben sich Spitzenkonzentrationen im Blut der Säuglinge von 0,0141 ‰. Diese Werte sind deutlich höher als bei den von uns ermittelten Expositionen nach Alkoholgenuss der Mutter. Es scheint daher zulässig, Empfehlungen wie „gelegentlich 1 bis 2 Gläser Wein“ und „gelegentlicher Konsum ohne schädigende Wirkung auf das Kind“, als übereinstimmend mit wissenschaftlichen Daten zu sehen.

Ein weiteres Kinetik-Modell befasste sich mit Polymorphismen Bisphenol-A-metabolisierender Enzyme. Hintergrund sind auch hier teilweise widersprüchliche Aussagen zu gemessenen BPA-Konzentrationen im Blut ausgewählter Probanden in der wissenschaftlichen Literatur, die auf experimentellen Daten beruhen. Die Ergebnisse wurden kontrovers diskutiert und führten zu Überlegungen, den von der EFSA festgelegten TDI von 0,05 mg/kg bw/day zu korrigieren. In einem physiologischen Modell wurde der BPA-Metabolismus im Menschen simuliert. Besonderes Augenmerk wurde hier auf Polymorphismen des primär metabolisierenden Enzyms UDP-Glucuronyltransferase 2B15 gelegt. Anhand von 15 publizierten individuellen intrinsischen Clearances des Enzyms UGT 2B15, die unterschiedlich ausgeprägte Polymorphismen aufwiesen, wurde das Modell erstellt. Bei den simulierten Plasmaspiegeln des BPA ergaben sich bei der C_{\max} und AUC zwischen der niedrigsten und der höchsten intrinsischen Clearance Faktoren von 4,7 respektive 4,6. Die polymorph exprimierten Enzyme von UGT2B15 können folglich starke Auswirkungen auf die systemisch verfügbare Dosis von BPA haben. Diese Ergebnisse können die publizierten Unterschiede in den BPA-Gehalten im Blut von sehr hohen Werten bis unterhalb der Detektionsgrenze erklären.

Mit dieser Arbeit konnte somit ein Beitrag zur Weiterentwicklung und Nutzung von *In-silico*-Modellen für diverse toxikologische Fragestellungen geleistet werden.

Summary

Animal experiments are common methods in toxicology for determination of the toxic potential of substances. In the last few years alternative methods to animal testing have gained in importance, particularly in the context of EU wide REACH legislation. The alternative methods are divided into *in vitro* and *in silico* methods. In this work, different concepts of *in silico* toxicology are discussed to gain an overview of the range of possible applications of computer-based calculations in toxicology. Although the development of *in silico* toxicology is still in its infancy, progress is made to get access to different areas of toxicology.

The topics in this dissertation range from quantitative structure-activity relationships (QSAR) via a new approach to the common TTC concept to modeling of alcohol and bisphenol A metabolism.

The chapter on QSAR is essentially concerned with the creation and analysis of a database of the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) with repeated dose studies of 28 and 90 days duration with a total of 878 substances in 896 trials. The design of the database has been adapted to the design of an existing database of the Fraunhofer ITEM from Hannover, the RepDose database. A total of 622 substances in 1877 studies are recorded in this database. By merging both databases a relatively large pool of data could be generated to be available for further analysis. The substances in both databases showed that the physicochemical properties and the toxic effects of substances match quite well. In addition, it was found that substances with lower molecular weight have increased potential for toxicologically relevant damage compared to larger molecules.

The TTC concept allows the user to set thresholds for substances of low level exposure when no experimental toxicological data is available. Using study NOELs of structurally related substances it is possible to determine a value below which the risk of adverse effects is very low and therefore acceptable. A common approach for generating data pools of similar substances is the classification of substances according to Cramer. In the Cramer classification substances are identified by their structure and assigned to the categories “nontoxic”, “possibly toxic” and “probably” or “significantly toxic”. Thereby thresholds are determined for each of the three classes. Depending on

the category in which an unknown substance is classified, the corresponding threshold applies for it. In this work, a large pool of data was generated by merging multiple databases. Specifically, these are the ELINCS database, the Munro database and a database containing so-called *food contact materials*. Thus, the classic TTC concept is based on the NOELs of known substances. A new approach of this study was to determine internal NOELs and thereby the determination of internal TTC values. This approach allows to subtract out the route of exposure and to apply established thresholds of oral exposure to substances that are absorbed through the skin for example. Using a software to determine the bioavailability of substances the internal NOELs were calculated. This work also dealt with a further difficulty of TTC values. Since the allocation to common Cramer classes is done very conservatively, substances are rarely assigned to the second class. In fact, most chemicals (> 78 %) are associated with the third class and are therefore considered to be “significantly toxic”. For this reason, the chemicals of the second and the third class were merged here. As expected, the analysis showed that the internal TTC values were lower than the normal “external” ones. Internal TTC values might be used in the regulatory field to abandon some tests, such as animal studies with repeated dosage. According to REACH, chemicals whose internal exposure is below the determined internal TTC values could be declared as ‘*no relevant human exposure*’ or ‘*no significant exposure*’ whereby animal experiments could be avoided.

Physiologically based kinetic modeling is used to simulate physiological processes in the human body and therefore allows to understand kinetic processes. As a result, exposures to chemicals after intake into the body can be simulated. In this work two different substances were investigated in physiological models. First, it was tried to simulate alcohol exposure of breast-fed babies, if the nursing mother had previously consumed various alcoholic beverages. Motives are contradictory recommendations for mothers consuming alcohol. In the model, it was shown that exposure of the child was consistently low, if the mother had previously taken in alcohol. Peak concentrations were 0.0034 ‰ in a newborn and 0.0039 ‰ in a 3-month-old infant, after maternal consuming of a glass of wine (0.25 l) immediately before the start of breast-feeding. For comparison, the exposure by an approved alcoholic herbal medicine for the treatment of flatulence in infants, which is not limited in the duration of application to children, was simulated. Peak concentrations reached 0.0141 ‰ in the blood of infants. These values are significantly higher than the exposure determined after the mother has drunken alcohol. Therefore, the findings appear to prove recommendations like “occasional moderate (1 to 2 glasses)” and “occasional consumption without damaging effect on the child” to be scientifically justified.

Summary

Another kinetics model focused on polymorphisms of bisphenol A metabolizing enzymes. Background is also partly conflicting evidence in the scientific literature on measured BPA concentrations in the blood of selected subjects based on experimental data. The results were discussed controversially and led to consideration whether the TDI of 0.05 mg/kg bw/day imposed by the EFSA has to be corrected. In a physiological model the BPA metabolism was simulated in man. Particular emphasis was put on polymorphisms of the primary metabolizing enzyme UDP glucuronyltransferase 2B15. The model has been created based on 15 published individual intrinsic clearances of the enzyme UGT 2B15 which had various distinct polymorphisms. The simulated C_{\max} and AUC plasma levels of BPA varied between the lowest and the highest intrinsic clearance factors of 4.7 and 4.6, respectively. Therefore the polymorphically expressed enzymes of UGT 2B15 may have a strong impact on the systemically available dose of BPA. These results may explain the differences of published BPA concentrations in the blood from very high levels to below the detection limit.

Thus, this work contributes to the development and use of *in silico* models for various toxicological problems.

1. Einleitung: *In-silico*-Toxikologie

In-silico-Toxikologie ist eine Wortschöpfung aus der Bioinformatik. Die Bezeichnung *silico* steht hierbei für Silizium. Bei Silizium handelt es sich um einen gebräuchlichen Werkstoff in der Halbleiterindustrie. Dies soll verdeutlichen, dass *In-silico*-Methoden auf computergestützte Berechnungen zurückgreifen. Der Begriff *in silico* ist angelehnt an die lateinischen Bezeichnungen *in vitro* für Gewebe- und Zellkulturen und *in vivo* für Versuche am lebenden Tier. So kann die *In-silico*-Toxikologie in gewisser Weise als drittes Standbein der toxikologischen Forschung angesehen werden. Ein wichtiger Teil der *In-silico*-Toxikologie sind die quantitativen Strukturaktivitätsbeziehungen (QSAR).

Das Forschungsfeld der *In-silico*-Toxikologie stellt ein stark interdisziplinär arbeitendes Gebiet dar. Es verbindet die moderne Toxikologie mit Teilbereichen der Bio- und Cheminformatik. Das bedeutet, dass Kenntnisse aus dem Bereich der Toxikologie mit computergestützten Anwendungen verknüpft werden. Der Begriff der *In-silico*-Toxikologie hat sich in den letzten Jahren jedoch gewandelt. Während man darunter zunächst lediglich die Vorhersage einer toxikologischen Wirkung aufgrund physikalisch-chemischer oder struktureller Eigenschaften verstand, so wird der Begriff mittlerweile deutlich weiter gefasst. Die rein strukturbasierte Vorhersage wurde mehr und mehr erweitert. Die Herleitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen hat zum Ziel, die komplexe Interaktion chemischer Stoffe zu biologischen und toxikologischen Endpunkten zu erfassen. Das Verfahren lässt sich so auf eine Vielzahl unterschiedlicher Stoffe wie Industriechemikalien, Lebensmittel samt Zusatzstoffen, Arzneimittel oder auch Kosmetika anwenden. Für letztere Gruppe sind die Verfahren von besonderem Interesse, da herkömmliche Testverfahren an Tieren für Kosmetika nicht mehr zugelassen sind (Abschnitt 5). Die Vermutung, dass eine direkte Beziehung zwischen der chemischen Struktur einer Substanz und deren biologischer Aktivität besteht, wurde schon Anfang des 19. Jahrhunderts aufgestellt (Abschnitt 2.1.1). Bei der Vorhersage differenziert man zwischen verschiedenen Ansätzen:

- *Read across* ermöglicht eine Vorhersage von Effekten eines Stoffes, indem von bekannten Effekten ähnlicher Stoffe abgeleitet wird.
- Gruppenbildung (*category approach*) bedeutet das Zusammenfassen von Chemikalien, die ähnliche Eigenschaften (physikalisch-chemisch oder toxisch) aufweisen.

- Strukturaktivitätsbeziehungen (*Structure Activity Relationships* - SAR) können qualitative Aussagen treffen, ob eine Substanz ein toxikologisches Potential besitzt. Hierbei wird z.B. auf *structural alerts* zurückgegriffen, also Strukturbestandteile, von denen bekannt ist, entsprechende Wirkungen hervorzurufen.
- Quantitative Strukturaktivitätsbeziehungen (*quantitative structure activity relationships* - QSAR) sind Erweiterungen von SAR, die auf mathematischen Modellen basieren, um die Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung zu quantifizieren.

Bei QSAR-Modellen wäre es in der Theorie durchaus möglich, zu jedem erfassten Endpunkt durch Auswertung eine entsprechende Regel zu erstellen. Diese Vorgehensweise wird erleichtert, wenn ein Effekt einem bekannten Mechanismus (*mode of action* - MoA) zugeordnet werden kann oder auch *Adverse Outcome Pathways* (AOP) definiert werden können. Können einem Effekt jedoch weder MoA noch AOP zugeordnet werden, oder ist ein Effekt die Folge mehrerer Mechanismen, so ist eine Regelerstellung für QSAR nur bedingt möglich. In diesem Fall wird eher auf *Read across* zurückgegriffen.

Eine Alternative stellt auch das TTC-Konzept dar (TTC - *Threshold for Toxicological Concern*). Mit Hilfe des TTC können Grenzwerte für Stoffe bekannter Struktur abgeleitet werden, für die keine toxikologischen Daten zur Verfügung stehen. Der Sinn des Konzepts ist das Screenen mehrerer Stoffe auf ihr Risiko für die menschliche Gesundheit (Abschnitt 3). Hierbei werden generische Grenzwerte für Stoffgruppen ähnlicher Eigenschaften erzeugt. Die Eigenschaften sind in der Regel struktureller Natur. Zur Klassifizierung von Stoffgruppen gibt es verschiedene Verfahren. Weit verbreitet ist die Klassifizierung nach Cramer. Diese erlaubt die Verteilung der Stoffe auf drei verschiedene Klassen (Cramer-Klasse I, II und III), die für „nicht toxisch“, „möglicherweise toxisch“ und „eindeutig toxisch“ stehen. Die Klassifizierung wird anhand strukturbasierter Separatoren vorgenommen. Liegt eine Exposition einer Substanz unterhalb des generierten TTC-Wertes der zugehörigen Cramer-Klasse, gilt das Risiko adverser Effekte auf die menschliche Gesundheit als gering, bzw. wird als nicht signifikant angesehen.

Toxikologische Vorhersagesysteme werden zum Teil kommerziell angeboten. In immer höherem Maße wird aber auch frei erhältliche Software verbreitet. Im Wesentlichen differenziert man zwischen zwei grundlegenden Ansätzen: Expertensysteme (XPS) sind wissensbasierte Computerprogramme, die den Nutzer bei der Entscheidungsfindung unterstützen. Sie stützen sich auf die Erfahrungen von Experten, die über die Identifizierung von *structural alerts* entsprechende Regeln erstellen. Auf der anderen Seite stehen statistik-basierte Systeme, die anhand von Deskriptoren mathematische Kor-

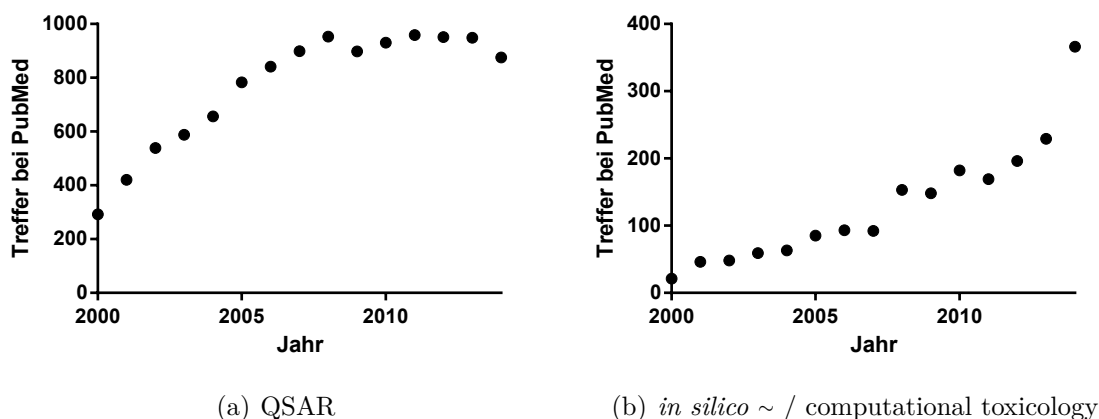


Abbildung 1.1.: Anzahl der Treffer bei PubMed zu *in silico* toxicology / computational toxicology und QSAR vom Jahr 2000 bis 2014. Es ist ein deutlicher Trend zu mehr Publikationen über die Jahre zu sehen.

relationen zwischen Struktur und Wirkung erstellen. Die verwendeten Deskriptoren können strukturelle oder physikalisch-chemische Parameter sein[1].

Zuletzt gewinnen toxikokinetische Modellierungen immer mehr an Bedeutung. Beim physiologisch basierten kinetischen Modelling (PBTK) werden mittels eines systemischen Ansatzes die physiologischen Prozesse der Kinetik in einem strukturellen und einem mathematischen Modell abgebildet. Mittels Programmierung werden die zur Lösung erforderlichen numerischen Algorithmen flexibel zur Anwendung gebracht. In Verbindung mit Dosis-Wirkungsmodellen ermöglichen diese Ansätze Vorhersagen über den zu erwartenden Effekt oder das Effektausmaß [1].

Voraussetzungen für Auswertungen und die Entwicklung von Modellen sind umfangreiche toxikologische Datenbanken. Um eine datenbankübergreifende Analyse zu ermöglichen, ist es hilfreich, bei Entwicklung und Pflege der Datenbanken auf einheitliche und konsistente Datensätze zu achten und möglichst einheitliches Vokabular zu verwenden. Dies gewährleistet eine Verknüpfung mehrerer Datenbanken miteinander, was den zur Verfügung stehenden Datensatz erheblich vergrößern kann und eine breitere Abdeckung der toxikologischen Endpunkte gewährleistet. Diese Vorgehensweise wurde bei dieser Arbeit in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 verfolgt.

Das wachsende Interesse an den hier behandelten Themen und ihre Bedeutung Bedeutung spiegelt sich in den stetig steigenden Zahlen an Publikationen wider, die zu den Themen *in-silico*- oder *computational toxicology* sowie QSAR bei Pubmed vom Jahr 2000 bis 2014 gefunden werden können (Abb. 1.1). Zu dem Stichwort QSAR finden sich deutlich mehr Treffer, die größte Zunahme zeigte sich jedoch mit 953 Übereinstimmungen bis zum Jahr 2007.

Auch im regulatorischen Umfeld fassen *In-silico*-Methoden zunehmend Fuß. Nicht zuletzt durch die Festlegung von Kriterien zur Validierung von (Q)SAR-Modellen für regulatorische Anwendungen (*Principles for the Validation, for Regulatory Purpose, of (Q)SARs*) durch die OECD konnten Grundvoraussetzungen geschaffen werden [2]. Weitere Anwendungsbereiche von QSAR im regulatorischen Umfeld werden in Abschnitt 2.1.3 beschrieben.

Die US-Amerikanische Umweltschutzbehörde *US Environmental Protection Agency* (EPA) hat Programme wie ToxCastTM und tox21 ins Leben gerufen. Ziel der Programme ist schon heute, klassische Tierversuche zu ersetzen oder einzusparen, indem Alternativmodelle und Computerverfahren zum Einsatz kommen. Der Ersatz von Tierversuchen durch geeignete Modelle wird auch als „Toxikologie des 21. Jahrhunderts“ beschrieben. Eine Umsetzung dieses Ziels wird noch Zeit brauchen. Bereits verfügbare Anwendungen werden allerdings bereits eingesetzt, sofern dies möglich ist.

Auch aktuell werden weiterhin Fördergelder in die Forschung zu *In-silico*-Methoden investiert. So auch im Rahmen EU-Forschungsprogramms HORIZON 2020, dem größten Forschungsprojekt der EU, das über sieben Jahre von 2014 bis 2020 Bestand haben soll [3].

2. Erstellung ELINCS-Datenbank

2.1. Einleitung

2.1.1. Geschichte und Grundlagen

Die Bezeichnung QSAR beschreibt für eine Substanz die quantitative Beziehung zwischen deren Struktur und einer entsprechenden Wirkung, wobei die Wirkung chemischer, biologischer, physikalischer oder pharmakologischer Natur sein kann. Computergestützte Vorhersagemodelle wie sie in der QSAR verwendet werden, weisen noch deutliches Verbesserungspotential auf, erfahren aktuell aber eine rasante Entwicklung, die der *In-silico*-Toxikologie stetig neue Anwendungsgebiete eröffnet. Somit wird die *In-silico*-Toxikologie den klassischen Prinzipien *in vitro* und *in vivo* zunehmend ebenbürtig. Dies liegt nicht zuletzt an der europäischen REACH-Verordnung, aufgrund derer umfangreiche finanzielle Mittel für Forschung und Entwicklung bereitgestellt wurden (Abschnitt 2.1.3).

Die Idee der Beziehung zwischen Struktur und Wirkung ist nicht neu. Schon 1839 erkannte James Blake in seinem *Mémoire sur les effets de diverses substances salines injectées dans le système circulatoire*, dass salzähnliche Verbindungen mit ähnlicher Struktur vergleichbare Effekte im Organismus hervorrufen können, wenn die Verbindungen direkt in das Blut injiziert werden [4]. Zwei Jahre später (1841), ergänzte er in einem weiteren Artikel: „...that all the salts having the same base exert similar actions when introduced directly into the blood.“ [5]

Im Jahr 1842 beobachtete der deutsche Chemiker Hermann Kopp, dass eine lineare Beziehung zwischen der Siedetemperatur von Alkanen zu deren Kettenlänge besteht und stellte damit eine weitere Beziehung von Struktur und Eigenschaft her. Er konnte die Temperaturunterschiede in den Kettenlängen mit 19 °C pro weiterer CH₂-Gruppe festlegen [6].

Sechszwanzig Jahre später, 1868, befasste sich Alexander Crum Brown, Chemieprofessor an der Universität Edinburgh mit quaternären Ammoniumsalzen, die ein Kollege 15 Jahre zuvor synthetisiert hatte. Er gab die Substanzen an seinen Kollegen

Thomas Fraser weiter, einen Professor der *Materia Medica*¹, damit dieser die Stoffe untersuchte. Fraser entdeckte auch hier, dass ähnliche Substanzen ähnliche Wirkungen aufwiesen [7]. In ihrer Publikation schrieben sie schließlich: „There can be no reasonable doubt that a relation exists between the physiological action of a substance and its chemical composition“ [8]. Diese Annahme bildet auch heute noch die Grundlage zahlreicher Vorhersagemodelle im Bereich QSAR.

2.1.2. Ausnahmen und Schwierigkeiten bei der Wirkungsbestimmung

Strukturaktivitätsbeziehungen beruhen also auf dem Prinzip, dass strukturverwandte Stoffe ähnliche Auswirkungen auf den Organismus haben. Diese Annahme ist so allerdings nicht immer ohne Einschränkungen gültig. Dies wird an folgendem Beispiel des Morphins und dessen Derivaten deutlich. Das Opium-Alkaloid ist bekanntermaßen ein stark wirkendes Analgetikum. Abbildung 2.1 führt neben dem Morphin noch Codein, Oxycodon, Hydromorphon, Thebain, Heroin und Hydrocodon auf (a - g), die alle analgetisch wirksam sind. Insofern trifft die Annahme der ähnlichen Wirkung bei ähnlicher Struktur zu.

Darüber hinaus zeigt die Abbildung aber noch Naloxon (h). Dies ist ebenfalls ein Derivat des Morphins und hat eine weitestgehend identische Struktur, abgesehen von der fehlenden Methylgruppe am Stickstoffatom und einer zusätzlichen Hydroxyl-Gruppe im Zentrum des Moleküls. Die Auswirkungen sind aber gravierend. Naloxon hat eine exakt gegenteilige Wirkung zum Morphin und wird dementsprechend als Opiatantagonist angewandt.

Diese Eigenschaft der Moleküle ist natürlich nicht sonderlich überraschend, denn sie alle müssen an den selben Rezeptor binden, um ihre Wirkung zu entfalten und um eine gewisse Rezeptoraffinität zu erreichen, ist eine ähnliche Struktur der Moleküle nötig, auch wenn sie ganz unterschiedliche Wirkungen haben können.

Es gibt noch weitere Beispiele, die aufzeigen, dass eine Vorhersage der Wirkung eines Stoffe nicht trivial ist. Bei der Entwicklung des HIV-Protease-Inhibitors Indinavir, gab es eine Reihe von Vorläufermolekülen, die zwar sehr potent und selektiv wirkten, allerdings eine schlechte Löslichkeit und daraus folgend auch eine schlechte Bioverfügbarkeit aufwiesen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Struktur des Vorläufers L-685,434 geringfügig geändert. Abbildung 2.2 zeigt diese Modifikationen. So konnte die Bioverfügbarkeit auf etwa 60% erhöht werden, wohingegen zuvor praktisch keine Bioverfügbarkeit vorhanden war [9].

¹Historischer Ausdruck der Lehre der Arzneimittel

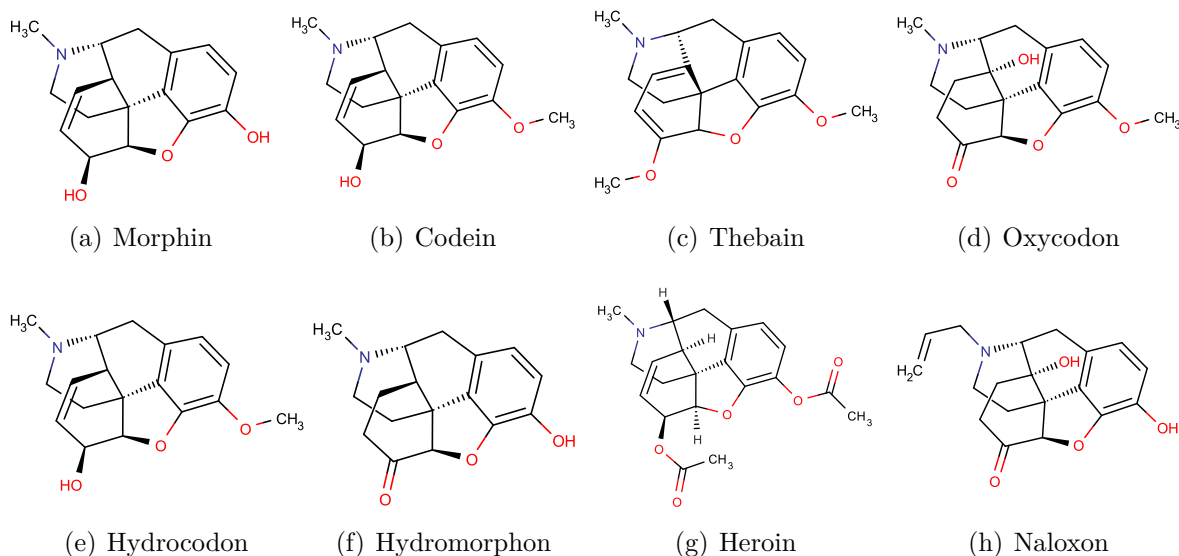


Abbildung 2.1.: Morphin und dessen Derivate. Alle Stoffe zeigen eine ähnliche Struktur und ähnliche Wirkung und Naloxon (h), welches aber als Opiat-Rezeptor-Antagonist wirkt und daher als Antidot bei Morphinintoxikationen verwendet wird.

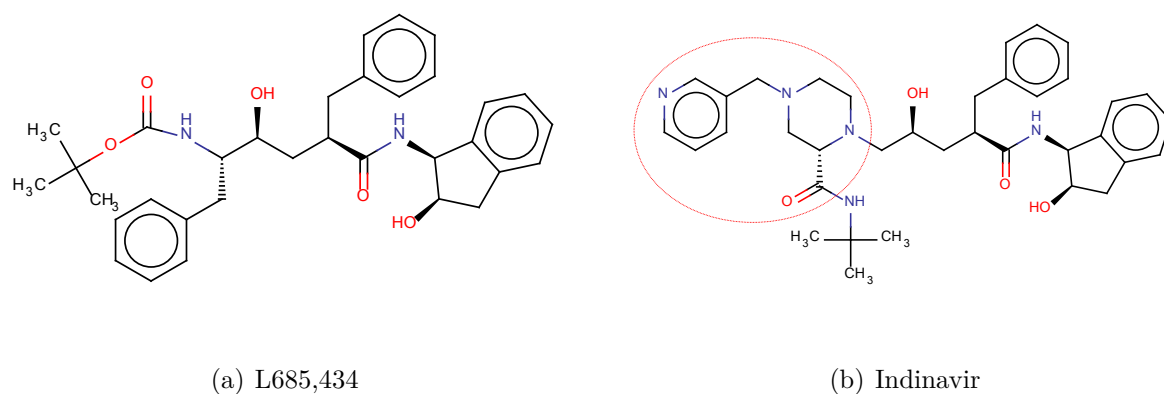


Abbildung 2.2.: HIV Protease-Inhibitor Indinavir und sein Vorläufermolekül L-685,434. Aufgrund geringer Modifikationen am Vorläufer konnte eine erhebliche Verbesserung der Bioverfügbarkeit erreicht werden.

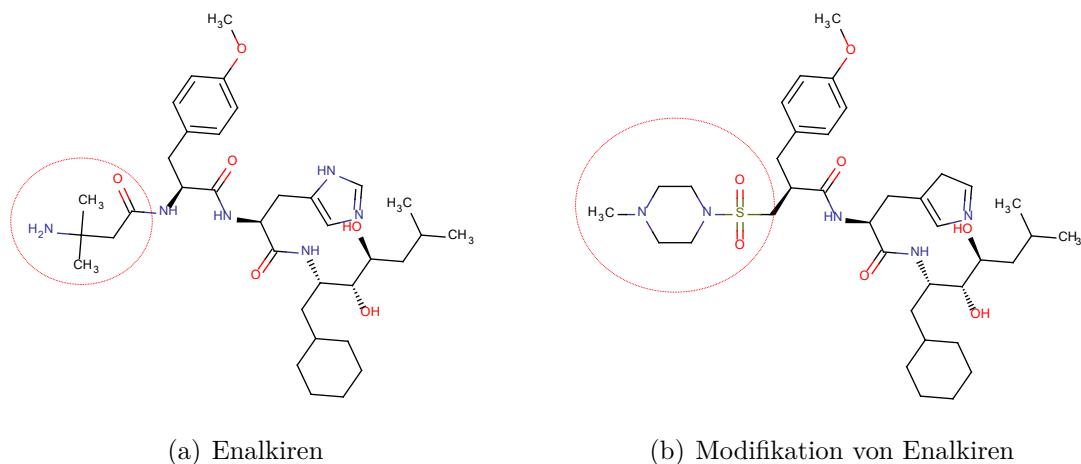


Abbildung 2.3.: Der Renin-Inhibitor Enalkiren mit einer Modifikation zur Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit.

Auch der Renin-Inhibitor Enalkiren, der zur Therapie der Hypertonie eingesetzt wird, ist ohne klinische Bedeutung, da er keine orale Bioverfügbarkeit (BV) aufweist und dementsprechend parenteral (i.v.) gegeben werden muss. Abbildung 2.3 zeigt auch hier die Änderungen am Molekül, durch die eine erhebliche Verbesserung der Bioverfügbarkeit erreicht werden konnte. Durch eine Reduktion der Anzahl der Wasserstoffbrücken wurde eine erhöhte Stabilität des Moleküls und eine erhöhte orale BV erreicht. Die BV wurde in Versuchen mit Hunden nachgewiesen und konnte mit 53 % ermittelt werden [9].

Nalidixinsäure, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Fluorchinolone, ist ein weiteres Beispiel dafür, dass geringe Molekülveränderungen weitreichende Folgen haben können. Der Wirkstoff wurde 1962 entwickelt und war das erste therapeutisch verwendete Chinolon (Abb. 2.4a). Durch Änderungen an Position C6 konnten dem Molekül andere Eigenschaften verliehen werden: Durch Substitution mit Fluor wurden Absorption und Aktivität des Stoffes gesteigert. Das erste Fluorchinolon war entwickelt. Auf der anderen Seite hatte die Substitution mit Fluor oftmals adverse Effekte zur Folge. Wurde nicht Position C6, sondern C8 substituiert, so erhöhte sich die Phototoxizität des Stoffes. Die Phototoxizität war in Abhängigkeit der Substituenten wie folgt ausgeprägt: $CF > CCl > N > CH > CCF_3 > COR$ (Abb. 2.4b). Hierbei bilden Halogene die höchste Toxizität aus und ein O-alkyl die niedrigste [10].

In einem vereinfachten Schaubild (Abb. 2.5) ist eine Zusammenfassung von Strukturaktivitätsbeziehungen der Chinolone dargestellt. In den Jahren der Entwicklung der Chinolone haben sich die optimalen funktionellen Gruppen an den jeweiligen Positionen der Chinolon-Grundstruktur herausgebildet. Die wichtigste Strukturänderung bezieht

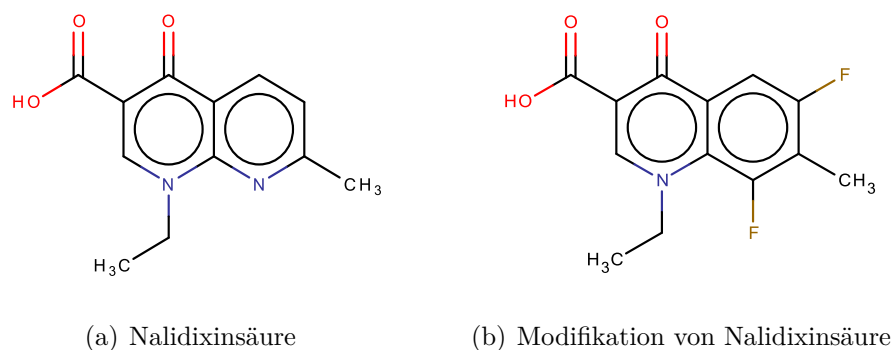


Abbildung 2.4.: In Abhängigkeit der Substitution an Position C6 oder C8 können erwünschte wie auch adverse Effekte erzielt werden.

sich dabei auf die Substitution mit Fluor an Position 6, welche eine Vervielfachung der Aktivität zur Folge hatte und zur Einführung der Fluorchinolone führte. Andere Substituenten können an entsprechend gewählten Positionen das Wirkungsspektrum zusätzlich erweitern oder auch zu weiteren Aktivitätssteigerungen führen. Ebenso sind Modifikationen möglich, die zu einer günstigeren Pharmakokinetik führen. An einigen anderen Stellen am Grundgerüst ist hingegen keine Modifikation möglich. So sind die Substituenten an Position 3 und 4 essenziell für eine Bindung des Stoffs an die bakterielle Gyrase, die den Hauptwirkort der Chinolone darstellt. Eine Modifikation dieser Positionen würde die Wirksamkeit der Arzneimittel dementsprechend stark einschränken oder gar zunichte machen [11, 12].

2.1.3. Spezielle Fragestellungen im regulatorischen Umfeld

Die europäische Chemikalien-Verordnung REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) ist am 1. Juni 2007 in Kraft getreten und stellt ein EU-weites Chemikalienrecht dar, das das vorherige Recht grundlegend vereinfachen soll. Dabei sieht die Verordnung eine Registrierung aller Chemikalien vor, die ein jährliches Produktionsvolumen von einer Tonne übersteigen. Ziel der Verordnung ist die effizientere Identifizierung und daraus resultierend die Vermeidung von Risiken für Menschen und Umwelt durch Chemikalien mit gefährlichen Eigenschaften. Dies soll durch systematische Zusammentragung von Informationen geschehen. Die Verantwortung geht dabei an die Industrie über, die einen sicheren Umgang mit den Substanzen von der Produktion bis zum Endprodukt gewährleisten muss. Darüber hinaus sollen der Industrie Anreize gegeben werden, problematische Substanzen durch ungefährlichere zu ersetzen, indem die Markteinführung neuer Substanzen erleichtert wird [13].

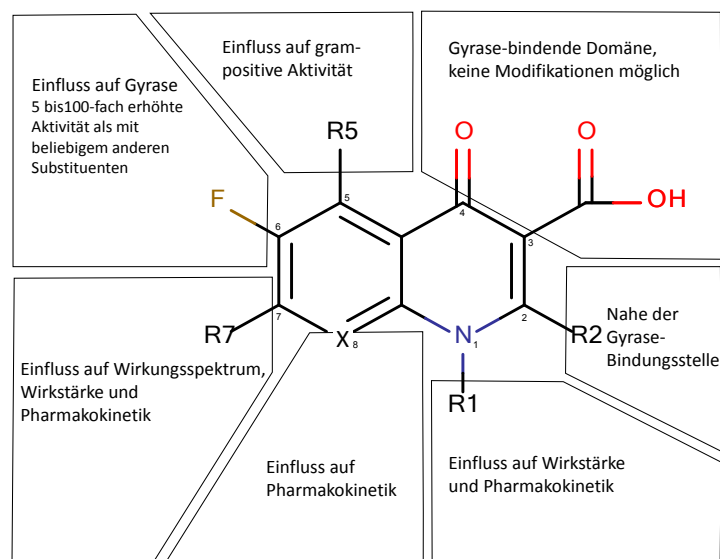


Abbildung 2.5.: Vereinfachte Zusammenfassung der Strukturaktivitätsbeziehungen (SAR) der Fluorchinolone. Abb. nach [11]

2.1.3.1. Anforderungen der Europäischen Chemikaliengesetzgebung

Um eine Risikobewertung vorzunehmen, müssen Informationen zu verschiedenen toxikologischen Untersuchungen vorliegen. Standardmäßig werden bei betroffenen Chemikalien Informationen über die physikochemischen Daten gefordert. Darüber hinaus werden Informationen zu Hautirritation und -korrosion verlangt, ebenso wie zu Augenirritation und Hautsensibilisierung. Untersuchungen auf mutagene Eigenschaften werden mit *In-vitro*-Genmutations-Studien eingefordert und akute Toxizitätsstudien durch einmalige (vorzugsweise orale) Verabreichung durchgeführt. Zusätzlich werden ökotoxikologische Daten generiert.

Stoffe mit einer jährlichen Produktionskapazität von 10 Tonnen oder mehr, erfordern darüber hinaus weitergehende Mutagenitätsuntersuchungen, die auf der Grundlage von *In-vitro*-Genotoxizitätstests an Säugerzellen oder Mikrokerntests durchgeführt werden. Sofern sämtliche Tests negativ ausfallen, wird außerdem eine *In-vitro*-Genmutationsstudie verlangt. Innerhalb des Produktionsvolumens ≥ 10 t/a sind zusätzlich Toxizitätsstudien nach wiederholter Gabe über 28 Tage (subakut) vorgeschrieben sowie Tests zur Reproduktions- und Entwicklungstoxizität in einer Spezies.

Für Substanzen, die ein jährliches Produktionsvolumen von 100 Tonnen übersteigen, sieht die neue Verordnung weitergehende Informationen über physikochemische Daten vor, wie auch die Durchführung einer subchronischen Studie über 90 Tage. Sofern sich bei den subchronischen und subakuten Studien adverse Effekte auf Reproduktionsorgane oder -funktionen zeigen, müssen Studien zur pränatalen Entwicklung wie auch

Zwei-Generationen-Studien durchgeführt werden. Ökotoxikologisch verlangt die Verordnung bei dieser Tonnage unter anderem Langzeit-Studien in Vertebraten.

Sofern es sich um Stoffe mit einem Produktions- oder Importvolumen ≥ 1000 Tonnen pro Jahr handelt, sind wiederum weitere toxikologische und ökotoxikologische Untersuchungen nötig, die allerdings teilweise in Abhängigkeit stehen mit Testergebnissen niedrigerer Tonnagen. Zudem müssen hier Studien zur Reproduktionstoxizität durchgeführt werden, die Entwicklungs- und Zwei-Generationen-Studien umfassen.

Karzinogenitätsstudien sind vorgesehen, sofern die Substanz eine weit verbreitete Anwendung findet und falls die Substanz als mutagene Substanz der Kategorie 3 nach Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) eingeordnet ist. Stoffe der Kategorie 3 haben eine möglicherweise erbgutverändernde Wirkung, wobei Hinweise aus Mutagenitätsstudien vorliegen, aber nicht ausreichen, um den Stoff in Kategorie 2 einzuordnen. Stoffe der Kategorie 2 sollten als erbgutverändernd für den Menschen angesehen werden, da es hinreichende Anhaltspunkte und begründete Annahmen gibt, dass der Stoff vererbare Schäden hervorrufen kann. Kategorie 1 beinhaltet Stoffe, von denen eindeutig bekannt ist, dass sie erbgutverändernd wirken. Studien zur Kanzerogenität sind ebenfalls für den Fall vorgeschrieben, dass aus Studien mit wiederholter Gabe geschlossen werden kann, dass die Substanz hyperplastische oder präneoplastische Läsionen verursachen kann. Die Ökotoxikologie verlangt bei diesem Volumen im Wesentlichen weiterreichende und umfangreichere Tests, als sie schon bei geringeren Tonnagen verlangt werden [13]. Eine Übersicht hinsichtlich der vorgeschriebenen Toxizitätsuntersuchungen ist in Tabelle 2.1 aufgestellt.

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf einer Analyse der toxikologischen Studien mit wiederholter Gabe, die einen Zeitraum von 28 Tagen (subakut) und 90 Tagen (subchronisch) umfassen.

2.1.3.2. QSAR und Einschränkungen von Tierversuchen unter REACH

Im Rahmen der REACH-Verordnung nimmt das Thema QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) eine entscheidende Rolle ein, da ein großer Bedarf an Daten zu den Eigenschaften der Chemikalien besteht. So wird die Nutzung validierter QSAR-Methoden häufig innerhalb der Verordnung erwähnt. Die Richtlinie sieht vor, dass Informationen über grundlegende Eigenschaften der Chemikalien nicht zwangsweise Tierversuche erfordern. Einer Studie des *Institute for Health and Consumer Protection* des *Joint Research Centers* (JRC) zeigte, dass insbesondere *In-vivo*-Studien zur Mutagenität, zur Entwicklungstoxizität und zur Reproduktionstoxizität einen enormen Bedarf an Versuchstieren haben [15].

Tabelle 2.1.: REACH-Anforderungen an Toxizitätsuntersuchungen hinsichtlich unterschiedlicher Tonnagen. (Nein) bedeutet, dass ein Test nicht vorgesehen ist, aber hinsichtlich bestimmter Kriterien doch durchgeführt werden muss, (Ja) bedeutet dementsprechend, dass von einem Test unter Umständen abgesehen werden kann. Nach [14].

Kategorie	Tonnen/Jahr				
	< 1	≥ 1	≥ 10	≥ 100	≥ 1000
chronische Toxizität und Karzinogenität	Nein	Nein	Nein	Nein	(Ja)
Reproduktionstoxizität (1 Generation)	Nein	Nein	Nein	(Ja)	(Ja)
subchronische Toxizität (90 Tage)	Nein	Nein	Nein	(Ja)	(Ja)
Screening nach Reprotoxizität	Nein	Nein	(Ja)	(Ja)	(Ja)
subakute Toxizität (28 Tage)	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
akute Toxizität	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
Haut- und Augenirritation (<i>in vivo</i>)	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
weitere Mutagenitätstests (<i>in vitro</i>)	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
akute Toxizität oral verabreicht	Nein	(Nein)	Ja	Ja	Ja
Mutagenität (<i>in vitro</i>)	Nein	(Nein)	Ja	Ja	Ja
Hautsensibilisierung	Nein	(Nein)	Ja	Ja	Ja
Haut- und Augenirritation (<i>in vitro</i>)	Nein	(Nein)	Ja	Ja	Ja

Die Verordnung fordert nun, dass Informationen zur Humantoxikologie, wann immer möglich, nicht durch Tierversuche erzeugt werden sollen, sondern vielmehr durch Nutzung alternativer Methoden, welche *In-vitro*-Methoden, aber eben auch *In-silico*-Modelle auf der Basis von qualitativen oder quantitativen Strukturaktivitätsbeziehungen umfassen. Darüber hinaus sieht die Verordnung vor, dass auch Informationen über strukturverwandte Stoffe verwendet werden sollen. Auch andere Methoden als QSAR können verwendet werden und die Testmethoden müssen nicht zwangsweise OECD-konform sein [13].

Desweiteren wird QSAR als Standard-Informationsanforderung für Substanzen, die in Mengen von 10 Tonnen und mehr importiert oder produziert werden, aufgeführt. Unter dem Punkt '8.7 *Reproductive Toxicity*' gilt QSAR als Indikator-Testsystem für Effekte auf die Entwicklung, das durch *In-vitro*- und *In-vivo*-Methoden für Reproduktions- und Entwicklungstoxizität komplettiert wird.

Zusammenfassend kann (Q)SAR innerhalb der REACH-Verordnung ein entscheidender Beitrag in der Anpassung von Standard-Tests beigetragen werden. Gleichzeitig wird eine erhöhte Relevanz zur Ermittlung krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender (CMR = *Carcinogenic, Mutagenic and toxic to Reproduction*) Eigenschaften innerhalb der niedrigsten Tonnage verzeichnet.

2.1.4. Bedarf an QSAR

QSAR beruht auf der Annahme, dass die Wirkung eines Moleküls auf dessen Struktur zurückzuführen ist und daher die Möglichkeit besteht, Voraussagen zur Toxizität aus der Struktur des Moleküls zu treffen, was bislang auf Grundlage von Tierversuchen oder alternativen *In-vitro*-Testmethoden erreicht wurde. Die Idee hinter QSAR ist hingegen, auf Versuche jeglicher Art zu verzichten, was den Aufwand und die Kosten erheblich reduzieren würde.

In der Vergangenheit hatte sich gezeigt, dass die Industrie oft keine hinreichenden Informationen über ihre Chemikalien und Produkte zur Verfügung stellte oder nicht in der Art veröffentlichte, wie es die neue Verordnung erfordert [16]. Die European Consensus Platform on Alternatives (ECOPA), eine nichtstaatliche Organisation aus Wissenschaftlern, äußerte Bedenken insofern, als die neue Regulierung einen massiven Anstieg an Tierversuchen zur Folge habe. Da bei der Entwicklung der REACH-Verordnung der Tierschutz eine grundlegende Rolle spielen sollte, wurden die Bedenken durch das Europäische Parlament geteilt. Aufgrund der Masse an geforderten Daten beschloss die Europäische Kommission, dass die REACH-Verordnung auch einen Verzicht auf die Durchführung von Tierversuchen vorsieht, sofern die erforderlichen Informationen zur Toxizität auch durch validierte „*non-animal test systems*“ geliefert werden können, zu denen auch quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gehören (EEC 86/609/EEC) [17].

Insofern gibt es viele Aktivitäten zur Entwicklung und Nutzung von Software, die sich mit dieser Methode befasst. Die *Computational Toxicology Group* des *Joint Research Center* (JRC) bildet in der EU das Kernelement im Rahmen von QSAR. Desweiteren gibt es viele EU-Programme, die sich mit dem Thema befassen und neue Modelle entwickeln oder bereits bestehende Modelle validieren.

Das primäre politische Ziel der REACH-Verordnung liegt in der Identifizierung und Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt aufgrund gefährlicher Eigenschaften von Chemikalien. Im regulatorischen Bereich wird das politische Ziel durch Gefährdungsidentifikation erreicht, indem Vorgaben zur Klassifizierung und Kennzeichnung erstellt werden.

Momentan ist es sehr fragwürdig, ob (Q)SAR-Modelle allein ausreichen, um hinreichende Informationen für solche regulatorischen Zwecke bei allen Substanzen und für alle Substanzeigenschaften zu liefern, da dafür die Entwicklung entsprechender Tools noch nicht weit genug fortgeschritten ist. Insofern begrenzen sich die hauptsächlichen Anwendungsgebiete von (Q)SAR-Tools unter REACH derzeit auf Chemikalien, deren Produktionsvolumen unterhalb einer Tonne pro Jahr liegen und für die keine ökotoxikologischen Daten zusammengetragen wurden. Davon abgesehen liegt das Hauptau-

genmerk der Nutzung auf der Kategorisierung von Chemikalien, um eine Basis zur Klassifizierung und Kennzeichnung von Chemikalien innerhalb einer Gruppe zu erzeugen. Einen weiteren Anwendungsbereich bildet die Beurteilung zur Klassifizierung von persistierenden bioakkumulativen toxischen (PBT) oder sehr persistierenden und sehr bioakkumulativen (engl. Abk. vPvB) Chemikalien.

Es gibt aber auch Bemühungen, (Q)SAR in weiteren regulatorischen Anwendungen einzusetzen, wie sie im Folgenden beschrieben werden sollen.

2.1.5. Weitere Anwendungsmöglichkeiten von QSAR

Nicht nur im Rahmen der REACH-Verordnung ist QSAR von Bedeutung, es findet auch in vielen weiteren Bereichen Anwendung.

So werden beispielsweise in der Nahrungsmittelindustrie QSAR-Modelle verwendet, um die Toxizität von Inhaltsstoffen zu identifizieren. Angesichts der Fülle der Stoffe und den damit verbundenen Schwierigkeiten, alle enthaltenen Stoffe zu testen, wird QSAR benutzt, um Prioritäten für die Testung *in vivo* zu setzen. Weitere Gruppierungen aufgrund struktureller Eigenschaften erfolgen bei toxikologischen Studien an Säugetieren. Hier ist es möglich, aufgrund der Gruppierungen Endpunkte für strukturell verwandte Chemikalien von wenigen experimentellen Daten abzuleiten [18].

Innerhalb der EU ist es üblich, unter bestimmten Voraussetzungen QSAR-Modelle zur Verifizierung klassischer Tests zu verwenden, sofern diese nicht optimal durchgeführt wurden. So ist es innerhalb von Toxizitätsstudien an Säugetieren möglich, Substanzen mit QSAR-Modellen auf irritative oder korrosive Eigenschaften zu überprüfen, wenn die klassischen Tests uneindeutige Ergebnisse liefern [13].

QSAR-Bewertungen wurden auch schon in der Vergangenheit eingesetzt, um grundlegende physikochemische Daten von zu untersuchenden Stoffen zu erhalten. Hierbei dienten die Vorhersagen zusätzlichen experimentellen Daten zur Unterstützung, konnten in Ausnahmefällen aber auch einen höheren Stellenwert als die experimentell ermittelten Daten einnehmen, wenn es bei letzteren zu Problemen bei den Testdurchführungen kam, die Zweifel an deren Aussagekraft rechtfertigten [13].

Vorhersagen wurden auch vereinzelt genutzt, um den Nachweis zu erbringen, dass bei einigen Molekülen sogenannte *structural alerts*, also Strukturbestandteile, die charakteristisch für eventuelle chemische Eigenschaften sind, nicht vorhanden waren und somit von der Testung auf bestimmte physikochemische Eigenschaften, wie Explosivität, oxidative Eigenschaften oder Entflammbarkeit abgesehen werden konnte [13].

Akute und chronische Toxizität werden unter ökotoxikologischen Gesichtspunkten häufig an Algen, Daphnien und Fischen getestet. Die Vorgehensweise ist dabei immer experimentell. Es wird aber teilweise auch so verfahren, dass die Daten einer der

Spezies nicht experimentell ermittelt, sondern die Wirkmechanismen mittels QSAR extrapoliert werden [19, 20, 21].

Auch in der pharmazeutischen Industrie gewinnen Modelle zunehmend an Bedeutung, um eventuell toxische Verbindungen zu erkennen oder eventuelle Verunreinigungen im Endprodukt zu beurteilen und im Zweifelsfall die weitere Entwicklung des Stoffes frühzeitig zu stoppen, um unnötige Kosten zu vermeiden. Ein Nutzen wird insbesondere dann deutlich, wenn man bedenkt, dass für jedes Medikament, das Marktreife erlangt, durchschnittlich neun andere in ihrer Entwicklung zu einem relativ späten Zeitpunkt aus verschiedenen Gründen abgebrochen werden müssen. Je später die disqualifizierenden Eigenschaften erkannt werden, desto mehr finanzielle Mittel sind schon in die Entwicklung geflossen. Oftmals werden Substanzen erst in der klinischen Phase als unbrauchbar identifiziert. In diesem Stadium, dem letzten vor der Markteinführung, ist ein Abbruch der Studie der schlechteste Fall für Pharma-Unternehmen. Sollte es möglich sein, entsprechende Eigenschaften mittels QSAR schon in der Frühphase zu erkennen, könnten die Entwicklungskosten neuer Medikamente drastisch gesenkt werden [22].

QSAR lässt sich aber auch invers anwenden. So ist es möglich, durch inverses QSAR chemische Strukturen mit gewünschten Eigenschaften zu generieren, was eines der zentralen Felder des computergestützten molekularen Designs ist. Das Ziel der Struktur-Generierung ist es, vielversprechende Moleküle zu finden, die, in Bezug auf statistische Modelle, definierte Eigenschaften aufweisen sollten [23].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einsatz von QSAR zur Vorhersage chemischer Eigenschaften bestimmter Stoffe (in Europa) noch recht eingeschränkt ist. Dies liegt im Wesentlichen darin begründet, dass frühere europäische Richtlinien ausschließlich experimentell ermittelte Daten anerkannt haben, die durch die Industrie bereitgestellt werden mussten. Hierbei war der Umfang der Daten zwar auch abhängig vom Produktionsvolumen der Stoffe, durch die vom Gesetzgeber verlangte Generierung der Daten durch rein experimentelle Arbeitsweisen war allerdings kein wesentlicher Ruf nach alternativen Methoden vorhanden. Somit wurde die Entwicklung entsprechender Tools auch nicht so vorangetrieben, wie es nun durch die neue REACH-Verordnung der Fall ist und somit gibt es bislang keine Software, die für den Endpunkt Toxizität für sich allein eine vollständige und zuverlässige Vorhersage bietet.

2.1.6. Geforderte Eigenschaften eines QSAR-Tools

Zur Validierung von QSAR-Modellen wurde von der OECD im Jahr 2004 ein System aus fünf Punkten vorgeschlagen. Die Aufzählung beinhaltet keine wirkliche Validie-

rungs-Prozedur, aber ermöglicht eine Abschätzung der Nützlichkeit eines QSAR-Tools. Ein potentes Tool sollte demnach folgende Eigenschaften aufweisen [13]:

1. Es müssen toxikologische Endpunkte definiert werden, die auf einer qualitativ und quantitativ guten Datenlage beruhen.
2. Es sollte ein eindeutiger Algorithmus verwendet werden, der das angewandte mathematische Modell transparent beschreibt.
3. Die Anwendungsmöglichkeiten und damit die Grenzen sollten klar definiert sein.
4. Informationen zur Anpassungsgüte und Vorhersagbarkeit des Algorithmus sind entscheidend.
5. Die Wirkung des Stoffes sollte auf physikochemische Stoffeigenschaften zurückzuführen sein, um eine quantitative Vorhersage zu treffen.

Eine Berücksichtigung dieser Validierungs-Prinzipien könnte die Anwendungsmöglichkeiten von QSAR-Tools natürlich beeinträchtigen, allerdings kann nur so gewährleistet werden, dass falsche Vorhersagen weitestgehend ausgeschlossen sind.

2.1.7. Weitere QSAR-Betrachtungen unter REACH in der EU

QSAR-Modelle haben nicht allein den Zweck, verwertbare Aussagen zu treffen, indem für jeden Anwendungszweck ein entsprechendes Tool entwickelt wird, sondern sollen auch Entscheidungsfindungen unterstützen, wenn keine adäquate Software zur Verfügung steht. Laut Annex XI der REACH-Verordnung wird SAR berücksichtigt, um Gruppen oder Kategorien zu bilden. Dabei fallen Substanzen dann in eine Gruppe oder Kategorie, wenn sie in ihren physikochemischen, ökotoxikologischen und toxikologischen Eigenschaften einen gewissen Grad an Ähnlichkeit aufweisen.

Durch die Gruppierung und Kategorisierung soll es möglich werden, die physikochemischen, ökotoxikologischen und toxikologischen Eigenschaften einer Chemikalie vorherzusagen, ohne dass experimentelle Daten vorliegen. Dies soll ermöglicht werden, indem diese Daten mittels Interpolation von ähnlichen Substanzen vorhergesagt werden.

Eine Voraussetzung hierfür ist natürlich, dass die Daten, von denen neue Daten interpoliert werden, auf experimentellem Wege erhalten worden sind und nicht ihrerseits durch Interpolation anderer Daten, was neue Fehlerquellen zur Folge haben könnte.

Die Ähnlichkeiten können dabei auf vielfältige Weise vorliegen. Oftmals geben gemeinsame strukturelle Eigenschaften wie funktionelle Gruppen schon eine hinreichende

Begründung für die Kategorisierung der Stoffe. Ebenso können Kategorisierungen aufgrund von bekannten gemeinsamen Ausgangsstoffen vorgenommen werden, die ähnliche Eigenschaften der Endsubstanzen vermuten lassen.

2.1.8. Entwicklungsstand

Der Entwicklungsstand von QSAR-Modellen variiert stark in Abhängigkeit vom Einsatzgebiet. So wurden beispielsweise mit Modellen für Mutagenität von aromatischen Aminen sehr gute Resultate erzielt. Aromatische Amine kommen ubiquitär in Nahrungsmitteln und Umwelt vor und stellen dementsprechend eine beachtenswerte Expositionsquelle dar. Im Körper können sie nach metabolischer Aktivierung an DNA binden und somit Mutationen hervorrufen, die ihrerseits zu Kanzerogenität führen können. Die Vorhersagekraft der Modelle für diese Stoffe stimmt mit experimentell ermittelten Werten gut überein [24].

Während also QSAR-Modelle im Bereich von Genotoxizität schon recht weit fortgeschritten sind und zufriedenstellende Ergebnisse liefern, stellt die Entwicklung von Modellen für die Toxizität nach wiederholter Gabe eine besondere Herausforderung dar.

Auch im Bereich der Ökotoxikologie sind schon Fortschritte zu verzeichnen. So werden mehr und mehr QSAR-Programme als Web-Applikationen bereitgestellt, die dementsprechend kostenlos erhältlich sind. Demgegenüber gibt es aber auch zahlreiche Entwicklungen, die nur kommerziell erhältlich sind. Die kommerzielle Nutzung ist natürlich nachvollziehbar, da die Entwicklung einer Software mitunter mit erheblichen Kosten in Verbindung steht, doch schränkt die kommerzielle Nutzung die Verbreitung und Verbesserung der Software ein. Besonders in Universitäten und Regierungsbehörden sind kommerzielle Produkte eher selten vertreten.

Weitere Einschränkungen sind häufig, dass die Software nicht validiert werden kann und dass bei der Entwicklung keine hinreichend großen Testdatensätze zur Verfügung standen. Wichtig ist bei den Datenbanken, die die Testdatensätze enthalten, dass sie balanciert sind, das heißt, dass sowohl positiv als auch negativ getestete Stoffe zu dem entsprechenden Endpunkt zur Verfügung stehen. Das Problem der eingeschränkten Validierungen tritt insbesondere bei den kommerziell erhältlichen QSAR-Tools auf. Ohne eine kritische Verifizierung ist es aber praktisch ausgeschlossen, solche Produkte für regulatorische Zwecke einzusetzen.

Modelle, die keiner Verifizierung unterzogen wurden, haben oftmals im praktischen Einsatz enttäuschende Ergebnisse geliefert. Bei Tests im Bereich von *In-silico*-ADME/Tox (ADME = Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination), also Modellen zur Pharmakokinetik und Toxikologie, konnte mehrfach gezeigt werden, dass Modelle,

die während der Entwicklung und der anschließenden Anwendung auf eigenen Testdaten zufriedenstellende bis sehr gute Ergebnisse gezeigt hatten, in der Praxis auf Fremddaten eher enttäuschend abschnitten [22].

Es wird vermutet, dass durch die neue Chemikalien-Verordnung viele schon verfügbare Daten der Firmen veröffentlicht werden, die bisher noch nicht publiziert waren. Neben dem Hauptaugenmerk, diese Daten zur Risikobewertung zu nutzen, könnten diese Daten auch als Testdatensätze dienen, mit denen schon bestehende QSAR-Modelle evaluiert und gegebenenfalls verbessert werden könnten. Zur Evaluierung bestehender Tools werden dabei umfangreiche Testdatensätze benötigt, die in umgekehrter Reihenfolge abgearbeitet werden. Das heißt, es müssen zunächst die Aktivitätsmechanismen betrachtet werden und anschließend die molekularen Eigenschaften, welche die biologische Aktivität bedingen [13].

2.1.9. QSAR in der Zukunft

Die Entwicklung von QSAR steht noch relativ weit am Anfang. Langfristig ist das Ziel, verlässliche Vorhersagen zu treffen, die alle Endpunkte (Toxikologie, Ökotoxikologie und Physiko-Chemie) abdecken. Die Modelle sollten dabei auf alle Substanzen anwendbar und frei verfügbar sein, für alle, die Bedarf an der entsprechenden Software haben.

Die Vorhersagemodelle umfassen ein weites Feld möglicher Anwendungsgebiete. So sollen sie nicht nur die Toxizität der Stoffe identifizieren, sondern ebenso eine Klassifizierung und Kennzeichnung ebendieser Stoffe ermöglichen.

Ausschlaggebend für ein optimales Modell ist auch, dass die Güte der Vorhersagen nicht geringer ist als die Güte eines einzelnen Modells, das etwa die Toxizität erfasst, aber nicht für alle Endpunkte verfügbar ist.

Gegenwärtig ist es praktisch unmöglich abzuschätzen, ob und inwieweit QSAR in der Risikobewertung zum Einsatz kommen kann, da zur Bestimmung eines NOAELs, also der Dosis, bei der kein toxischer Effekt auftritt, dosisabhängige Daten notwendig sind, die mit einem üblichen QSAR-Tool nicht erzeugt werden können. Erschwert wird die Bestimmung eines NOAELs (No Adverse Effect Level) zudem dadurch, dass sich gerade bei Studien mit wiederholter Gabe sehr viele Endpunkte in allen untersuchten Organen auftreten können, die alle zur Bestimmung des NOAELs beitragen können. Da dessen Modellierung sehr komplex ist, sind entsprechende Fortschritte in diesem Bereich noch sehr selten zu vermelden.

Im Bereich der Humantoxikologie gibt es einfach zu modellierende Endpunkte und solche, die nicht trivial zu modellieren sind. Einfach zu modellierende Endpunkte sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass sich ihre Toxizität auf die physikochemi-

schen Eigenschaften stützt und dass ihre Toxizitätsmechanismen zumindest teilweise verstanden sind, um sie nachzuvollziehen und in der Modellierung berücksichtigen zu können. Dazu gehören Haut- und Augenirritation oder -korrosion und bakterielle Mutagenitätstests (Ames-Test). Bei diesen Endpunkten sind entsprechende Tools schon erhältlich oder zumindest in der Entwicklung.

Zu den schwierig zu modellierenden Endpunkten gehören neben komplexen Mechanismen, die eine Toxizität verursachen und dementsprechend wenig erforscht sind, Metabolismus und interspezifische Variabilitäten, wie auch rezeptorvermittelte Effekte. Diese Endpunkte erfordern ganz neue Ansätze zur Modellierung und werden dementsprechend erst mittel- bis längerfristig Marktreife erreichen.

Im Rahmen der neuen REACH-Verordnung wird erwartet, dass mit den neu erhältlichen Informationen über die Toxizität von Chemikalien eine Vielzahl neuer Programme veröffentlicht werden und dass vorhandene Tools validiert und erheblichen Verbesserungen unterzogen werden können, wobei insbesondere eine Validierung unumgänglich für den Einsatz in regulatorischen Anwendungen ist.

Für die weitere Entwicklung von Vorhersagemodellen wird ein steigendes Potential prognostiziert [13]. So soll QSAR erheblich dazu beitragen, Prioritäten festzulegen. Damit wäre es möglich, zu erkennen, ob weitere Tests nötig sind und auf der anderen Seite können mittels QSAR direkt die Toxizitäten der Chemikalien charakterisiert werden.

2.1.10. Vorhersage toxikologischer Eigenschaften und Eingruppierungen

Für Arbeiten im Bereich der *In-silico*-Toxikologie werden umfangreiche Datensätze benötigt, die ausgewertet werden können. In dieser Arbeit wurde ein neuer Datensatz erstellt, der sich aus Industreichemikalien zusammensetzt. Dabei handelt es sich um Stoffe aus der *European List of Notified Chemical Substances* (ELINCS), eine Zusammenstellung von Chemikalien, die nach dem 18. September 1981 gemäß der Richtlinie 67/548/EEC registriert wurden und auch weiterhin noch registriert werden. Diese Zusammenstellung an Neustoffen führt das bisherige Altstoffverzeichnis der EU, das EINECS-Verzeichnis (*European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances*), fort. ELINCS-Einträge werden aufgeführt nach der EC-Nummer in der Form XXX-XXX-X oder nach der Registrierungs-Nummer der Form XX-XX-XXXX. In dieser Arbeit wurden die Stoffe lediglich nach der Registrierungsnummer benannt [25]. Dabei deuten die ersten beiden Ziffern auf das Jahr hin, die folgenden zwei Ziffern auf das Land der Untersuchung und die letzten vier sind fortlaufende Nummern für jede einzelne Studie, die sich pro Land über alle Jahre fortsetzt. Die Nummer 96-04-0902 be-

deutet in diesem Zusammenhang, dass der entsprechende Stoff zur Studie im Jahr 1996 registriert wurde. Ausführendes Land war mit 04 Deutschland und es war die 902. Registrierung in Deutschland. Eine Auflistung aller zweistelligen Ländercodes, die in der ELINCS-Datenbank auftreten, zeigt Tabelle 2.2. Die vollständige ELINCS-Datenbank wird für zuständige europäische Behörden (*European Competent Authorities*) frei zur Verfügung gestellt. Der Auszug der Stoffe aus der ELINCS-Datenbank, der hier verwendet wird, soll im Folgenden erläutert werden.

Tabelle 2.2.: Die mittleren beiden Ziffern der Registrierungsnummern der ELINCS-Datenbank beinhalten den Ländercode, also den Ort der Zulassung des Stoffs. Sie beinhalten EU-Länder sowie Norwegen [25].

01. Frankreich (FR)	11. Spanien (ES)	21. Litauen (LT)
02. Belgien (BE)	12. Portugal (PT)	22. Ungarn (HU)
03. Niederlande (NL)	13. Finnland (FI)	23. Malta (MT)
04. Deutschland (DE)	14. Österreich (AT)	24. Polen (PL)
05. Italien (IT)	15. Schweden (SE)	25. Slowenien (SI)
06. Vereinigtes Königreich (UK)	16. Norwegen (NO)	26. Slowakei (SK)
07. Irland (IE)	17. Tschechische Republik (CZ)	27. Bulgarien (BG)
08. Dänemark (DK)	18. Estland (EE)	28. Rumänien (RO)
09. Luxemburg (LU)	19. Zypern (CY)	
10. Griechenland (GR)	20. Lettland (LV)	

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Neustoff-Datenbank

Die im Rahmen dieses Projektes in die Datenbank eingetragenen Daten stammen ausschließlich aus dem Archiv des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und umfassen physikalisch-chemische und toxikologische Daten aus den Unterlagen der Neustoffanmeldung nach Chemikaliengesetz. Ursprünglich stammen die Daten von der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) aus Dortmund und wurden im Rahmen der Anmeldeverfahren nach ChemG durch die Hersteller eingereicht. Auf europäischer Ebene ist die offizielle Bezeichnung des Datensatzes ELINCS-Datenbank. Um sich für die Verarbeitung in der Datenbank zu qualifizieren, mussten die Chemikalien zwei Parameter erfüllen. Zum einen musste die Reinheit der Stoffe bei mindestens 90 % liegen, zum anderen wurden Studien mit oraler Gabe verwendet, also Studien, bei denen der Stoff per Magensonde, Futter oder Trinkwasser verabreicht wurde. Die Reinheit von $\geq 90\%$ ist für Untersuchungen mittels (Q)SAR entscheidend,

da bei zu starken Verunreinigungen der Stoffe nicht festgestellt werden kann, ob die auftretenden Effekte tatsächlich vom Stoff selbst hervorgerufen werden oder von einer der verunreinigenden Substanzen. Ein *cutoff* bei 90 % ist zwar nicht optimal, da auch geringste Verunreinigungen zu Verfälschungen der Ergebnisse führen können, ein höherer Wert hätte allerdings den Umfang der zur Verfügung stehenden Daten erheblich eingeschränkt.

Studien mit dermalen und inhalativer Exposition wurden hingegen nicht berücksichtigt. Das ist wichtig, um eine möglichst einheitliche Basis für die Auswertung der Daten zu erzeugen.

Insgesamt umfasst die vollständige Datenbank 878 Eintragungen verschiedener Aktenzeichen aus dem Archiv des BfR. Die Aktenzeichen entsprechen der Registrierungsnummer. Sämtliche Studien sind OECD-konform zu den Richtlinien 407 und 408 [26]. Da zu einzelnen Chemikalien mitunter mehrere Studien mit oraler Gabe durchgeführt wurden, sind in der Datenbank exakt 896 verschiedene Studien verzeichnet. Die 878 verschiedenen Eintragungen gehen allerdings nicht auch mit 878 verschiedenen Chemikalien einher, da die Liste, die die zu verarbeitenden Aktenzeichen enthielt, auch mehrere redundante Eintragungen auflistete, die unter Synonymen schon auf identische Studien verwiesen. Darüber hinaus fehlten bei einigen Aktenzeichen die entsprechenden Akten im Archiv, einige Akten enthielten aufgrund zu niedriger Tonnagen oder aus anderen Gründen keine subakuten oder subchronischen Studien und einige wenige Studien beinhalteten einen dermalen oder inhalativen Verabreichungsweg und wurden dementsprechend ausgeschlossen. Eine Liste sämtlicher in der Datenbank verzeichneten Aktenzeichen samt Erklärung, warum einige Stoffe nicht aufgenommen wurden, findet sich in Anhang A. Gemäß Tabelle 2.2 enthält die Datenbank 348 Registrierungen aus Deutschland, gefolgt von 196 Registrierungen aus dem Vereinigten Königreich. Weitere Plätze belegen Frankreich mit 65 Eintragungen, die Niederlande mit 52, Italien mit 50 und Irland mit 48 Registrierungen. Desweiteren sind in dieser Datenbank Belgien, Österreich, Spanien, Schweden, Dänemark und Portugal vertreten. Deutsche Registrierungen lagen im Archiv des BfR in der Regel in deutscher Sprache vor. Ansonsten war bei den weiteren Akten Englisch die Standardsprache. Eine Ausnahme bildeten die 65 Akten aus französischen Zulassungen. Diese waren auf Französisch geschrieben.

Weitere Informationen zu den Daten der Neustoff-Datenbank des BfR, wie sie in die RepDose-Datenbank eingegeben wurden, finden sich im Abschnitt 2.3: Ergebnisse.

2.2.2. RepDose-Datenbank

2.2.2.1. Allgemeines

Die RepDose-Datenbank ist eine relationale Datenbank, die Informationen zur Toxizität nach wiederholter Gabe erfasst. Dabei berücksichtigt sie industrielle organische Verbindungen, mit eindeutigen und nicht zu komplexen Strukturen. Somit bleiben Polymere und Gemische außen vor. In dieser Arbeit wurden subakute wie subchronische Studien verwendet. Im Rahmen eines LRI-Projektes (*Long-range Research Initiative*) des Verbandes der europäischen chemischen Industrie (CEFIC von frz. *Conseil Européen des Fédérations de l'Industrie Chimique*) wurde die Struktur der Datenbank vom ITEM in Hannover entwickelt. Ebendiese Struktur der RepDose wurde für die Entwicklung der Neustoff-Datenbank aus dem Archiv des BfR übernommen. Grundidee der Datenbank ist es, eine Basis für die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen für Toxizität nach wiederholter Gabe zu schaffen und ein Werkzeug zur vereinfachten Risikobewertung zu erzeugen.

Die Datenbank soll dazu beitragen, die Chemikalien, die weltweit verfügbar sind, besser und einfacher zu bewerten.

2.2.2.2. Implementierung der Datenbank

RepDose wurde mit Microsoft Access 2003[®] entwickelt. Dabei haben sich die Entwickler bewusst für Access[®] entschieden, da die Software weit verbreitet ist und auch ohne spezielle EDV-Kenntnisse bedient werden kann.

Für das Neustoff-Archiv des BfR wurde eine leere Maske der RepDose-DB verwendet, die mit den Daten des BfR gefüllt wurde. Im Folgenden wird die Datenbank des ITEM als RepDose-DB bezeichnet und die des BfR als Neustoff-DB. Durch die Verwendung des gleichen Grundmodells der Datenbank besteht der Vorteil einer einheitlichen Struktur, die einen einfacheren Vergleich ermöglicht und spätere Arbeiten mit beiden Datenbanken vereinfacht.

2.2.2.3. Bisherige Arbeiten am Datensatz

Arbeiten mit der Neustoff-Datenbank des BfR sind nicht neu. Auch im Bereich QSAR hat es schon Bemühungen gegeben, mit den Stoffen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden (Abschnitt 2.2.1), ein existierendes QSAR-Modell zu evaluieren, wie z. B. von Appel et. al. [27].

Allerdings wurden bei früheren Arbeiten lediglich die strukturellen und physikochemischen (PC)-Daten zur Entwicklung der Modelle herangezogen. In dieser Arbeit

erfolgt eine Erweiterung der Daten um eine Definition relevanter toxikologischer Zielorgane mit entsprechenden Effekten, um somit eine Verfeinerung bestehender Modelle zu erreichen. Auch wurden in dieser Arbeit mit der Erstellung der Datenbank die entsprechenden Neustoffe erstmals einheitlich standardisiert erfasst.

Die Daten werden aus subakuten und subchronischen Studien erhoben und dabei in das Format der RepDose-Datenbank (Abschnitt 2.2.2) des Fraunhofer ITEM überführt. Diese Arbeiten erfolgen unter Verwendung desselben Glossars, um eine maximale Übereinstimmung des Datenbankformats zu gewährleisten. Die so erzeugte Neustoff-Datenbank des BfR steht dabei als Testdatensatz physikalisch-chemischer, struktureller und toxikologischer Daten zur Verfügung.

2.2.3. Vergleich der Datenbanken

Zur Entwicklung von QSAR-Modellen sind umfangreiche Datensätze nötig. Ziel war es, die Daten der ELINCS-Datenbank mit den Daten der RepDose-Datenbank zusammenzulegen. Hierfür wurden zunächst bestimmte Parameter der Datenbanken verglichen. Darunter Häufigkeit der Effekte, Häufigkeiten der betroffenen Organe und physikochemische Daten wie logP, Molekulargewicht, Löslichkeit der Stoffe und Dampfdruck. Auch die LOELs wurden verglichen, was eine ungefähre Abschätzung der von den Stoffen verursachten toxischen Wirkungen ermöglichte.

2.2.4. Anpassung der Datenbanken

Die beiden Datenbanken enthielten insgesamt 214 verschiedene Effekte pro Organ. Diese sehr detaillierte Aufteilung der Effekte in der Datenbank zeigte sich später als nicht praktikabel, da es bei selteneren Effekten kaum zu Häufungen kam, die statistisch hätten ausgewertet werden können. Daher wurden zahlreiche Effekte zusammengelegt (Tabelle 2.3).

In den Datensätzen beider Datenbanken waren Stoffe enthalten, die sich nicht für Arbeiten mittels QSAR eignen und deshalb entfernt wurden. Dies konnte anhand der Struktur begründet sein, etwa bei Gemischen, bei denen aufgetretene Effekte nicht eindeutig Strukturfragmenten zugewiesen werden konnten. Andere Eintragungen waren fehlerhaft oder unvollständig, teilweise waren Einträge auch doppelt vorhanden. Nach einer Filterung der Daten blieben im Gesamtdatensatz der ELINCS- und der RepDose-Datenbank 899 verschiedene Strukturen übrig.

Tabelle 2.3.: Zahlreiche Endpunkte der Datenbank wurden zusammengefasst in gemeinsame Endpunkte wie Atrophie, Proliferation und Inflammation, um gehäufte Anzahlen zu bekommen.

Degeneration	Zellproliferation	Inflammation
Atrophie	Zellproliferation	Zirrhose
Zelldepletion	Foci	Eosinophile Strukturen
Fettdegeneration	Proliferation	Fibrose
Lipidose		Glomerulonephritis
Mineralisierung		Granulozyten
Nekrose		Granuloma
Polynucleäre Zellen		Infiltration
Pyknose		Inflammation
Vacuolisierung		Irritation
		Lymphozyten
		Makrophagen
		Nephrose

2.2.5. Zusammenhang physikochemische Parameter und Toxizität

Ein Zusammenhang der physikochemischen Parameter logP und Molekulargewicht auf die Toxizität sollte untersucht werden. Hierfür wurden die Stoffe aus ELINCS-Datenbank und RepDose-Datenbank nach ihrer Toxizität auf eine Achse aufgetragen. Um die Toxizität numerisch festzuhalten, wurde für jeden Stoff untersucht, wie häufig er insgesamt von Effekten betroffen war. Darüber hinaus wurde für jeden Effekt ermittelt, ob er eine hohe Toxizität aufweist, oder eine niedrige. Effekte, die bei einem hohen LOAEL auftraten galten als gering toxisch, trat ein Effekt bei einem niedrigen LOAEL auf, so wurde dieser mit einer hohen Toxizität bewertet. Effekte mit hoher Toxizität erhielten einen Wert von 2, Effekte mit einer niedrigen Toxizität erhielten einen Wert von 1. Die Summe der Werte aller Effekte pro Organ ergab somit einen Wert für die Toxizität. Die auf diese Weise ermittelten Stoffe mit der höchsten Toxizität hatten einen Wert von 32.

Nach einer grafischen Darstellung wurde für beide PC-Parameter der optimale Cutoff untersucht. Dieser Wert markiert den Punkt, an dem die Stoffe anhand ihrer PC-Parameter auf beste Weise voneinander getrennt werden. Dieser *Best Split* wurde mit dem Calinski&Harabasz-Kriterium ermittelt, einem Verfahren aus der multivariaten Varianzanalyse [28]. Der Wert wurde in den Abbildungen durch eine graue Linie markiert.

2.3. Ergebnisse und Diskussion

2.3.1. Allgemeine Ergebnisse der Neustoff-Datenbank

Im Folgenden sollen kurz die grundsätzlichen Eingaben der Datenbank umrissen werden. Wie bereits erwähnt, beinhaltet die Datenbank 878 verschiedene Eintragungen mit exakt 896 Studien. Das Neustoffarchiv des BfR enthielt dabei theoretisch nur 807 Datensätze, welche den erforderlichen Reinheitsgrad von $\geq 90\%$ aufweisen. Bei den 878 Eintragungen traten insgesamt 6109 Effekte auf, die sich der Häufigkeit nach geordnet auf die Organe aufteilten. Der Begriff „Organ“ bezeichnet hierbei nicht zwangsweise anatomisch korrekt ein Organ wie die Leber, sondern kann auch auf entsprechende Kategorien von klinisch-chemischen Parametern hinweisen. In dieser Datenbank betrafen die klinische Chemie 1252 Effekte, auf klinische Symptome fielen 1213 Effekte, gefolgt von hämatologischen Parametern mit 735 Effekten. Erst dann war die Leber betroffen mit 663 und die Niere mit 455 Effekten.

Die Häufigkeiten der betroffenen Organe sind zusätzlich in Tabelle 2.4 aufgelistet. Zudem enthält Abbildung 2.6 eine grafische Übersicht der Verteilung der Effekte. Es wird sofort ersichtlich, dass auf die beiden Parameter klinische Chemie und klinische Symptome den Hauptanteil mit 2465 Effekten oder 40,4% aller Effekte entfallen. Der besseren Übersichtlichkeit halber wurden sämtliche Organe, die zwanzig mal oder seltener von Effekten betroffen waren, als Insert im Diagramm gesondert aufgeführt.

Tabelle 2.4.: Alle in den Studien aufgetretenen Effekte mit den betroffenen Organen bzw. Laborwerten der Häufigkeit nach geordnet.

Sehr häufig	Häufig	Gelegentlich	Selten
klinische Chemie (1252)	Körpergewicht (293)	Schilddrüse (44)	ZNS (6)
klinische Symptome (1213)	Milz (217)	Herz (43)	Nase (6)
Hämatologie (735)	Urinanalyse (189)	Lymphknoten (42)	Hypophyse (6)
Leber (663)	Magen (150)	Lunge (40)	Speicheldrüse (5)
Niere (455)	Vormagen (121)	Nebenhoden (39)	Ösophagus (5)
	Nebenniere (102)	Hirn (27)	Fettgewebe (4)
	Hoden (89)	Samenblase (26)	Larynx (4)
	Thymus (87)	Prostata (23)	Vagina (4)
	Intestinum (75)	Haut (20)	Knochen (3)
		Ovar (19)	Luftröhre (3)
		Pankreas (17)	Mundhöhle (3)
		Knochenmark (16)	Ohr (3)
		Uterus (12)	Andere (3)
		Bauchhöhle (12)	Endokrines System (1)
		Auge (11)	Muskulatur (1)
		Blase (9)	Immunsystem (1)
		Gallenblase (8)	Rückenmark (1)
			Harnwege (1)

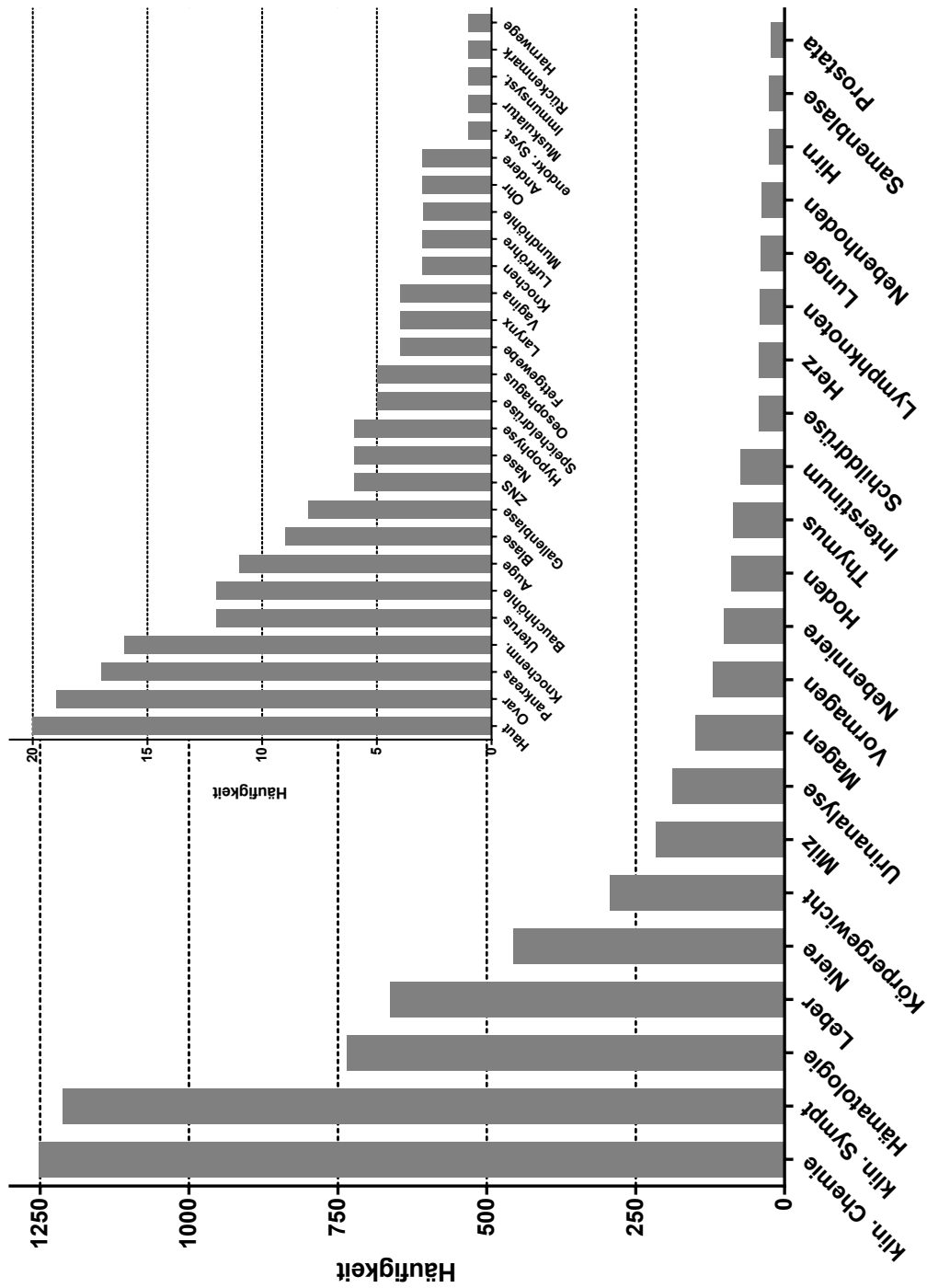


Abbildung 2.6.: Verteilung aller auftretenden Effekte in den Organen. Das Insert zeigt Effekte, die ≤ 20 mal aufgetreten sind.

Tabelle 2.5.: Auflistung aller Verabreichungswege in den Studien in Abhängigkeit der Häufigkeit sortiert. „Oral“ bedeutet hier, dass der Verabreichungsweg zwar oral, aber nicht näher definiert ist.

Magensonde	Futter	oral	ohne Angaben	inhalativ	Trinkwasser	dermal
693	102	34	34	22	5	4

Tabelle 2.5 enthält eine Übersicht über die Häufigkeit der verwendeten Verabreichungswege in sämtlichen Studien. Deutlich wird, dass die Verabreichung mittels Magensonde mit 77,3% am häufigsten angewendet wurde, gefolgt von Verabreichung mit dem Futter mit nur noch 11,4%. In der Datenbank wurden auch einige wenige Studien mit inhalativer oder dermaler Verabreichung verzeichnet. Im weiteren Verlauf der Dateneingabe wurden Studien dieser Verabreichungswege nicht weiter berücksichtigt, da nur orale Studien verwendet wurden. Bei 34 Studien wurde der Verabreichungsweg nicht genannt.

2.3.2. Effekte der sensitivsten Organe

Im Folgenden sollen die Organe näher beschrieben werden, die am häufigsten betroffen waren, wie in Abbildung 2.6 aufgelistet. Hierzu werden die aufgetretenen Effekte der Parameter klinische Chemie und der klinische Symptome detailliert beschrieben. Da der am dritthäufigsten betroffene Parameter, die Hämatologie, auch nicht den anatomisch korrekt bezeichneten Organen entspricht, wurde er ausgelassen und stattdessen die Leber und die Niere berücksichtigt.

Tabelle 2.6 enthält ebenso wie Abbildung 2.7 die Auflistung der aufgetretenen Effekte in der klinischen Chemie. Auffällig sind die zahlreichenden Auswirkungen auf die Enzymaktivität, die 17,3% aller Effekte des Organs ausmacht, gefolgt vom Cholesterolspiegel, der in 9,7% der Fälle verändert war. Veränderungen fassen hierbei sowohl Erhöhungen als auch Erniedrigungen der entsprechenden Spiegel zusammen. Nach dem Cholesterolspiegel ist eine konstante und relativ gleichmäßige Abnahme der Effekte auf die klinische Chemie zu erkennen, wobei Natrium der letzte Parameter ist, der noch gelegentlich betroffen war. Die weiteren Parameter waren nur sehr selten betroffen.

Tabelle 2.6.: Aufistung aller Effekte in der klinischen Chemie in den Kategorien sehr häufig (>90), häufig (>60) gelegentlich (>40) und selten.

sehr häufig	häufig	gelegentlich	selten
Enzymaktivität (216)	Glukose (67)	Gesamtprotein erhöht (56)	Phospholipide (14)
Cholesterol (121)	Triglyceride (65)	Chlorid (52)	Serumproteine (2)
Albumin (106)	Kreatinin (62)	Kalium (50)	Gallensäure (3)
Urea/Stickstoff (96)	Phosphor-Verb. (60)	Gesamtprotein erniedrigt (49)	Glycogen (1)
Bilirubin (91)		Globulin (47)	Lipide (1)
		Calcium (43)	Andere (7)
		Natrium (43)	

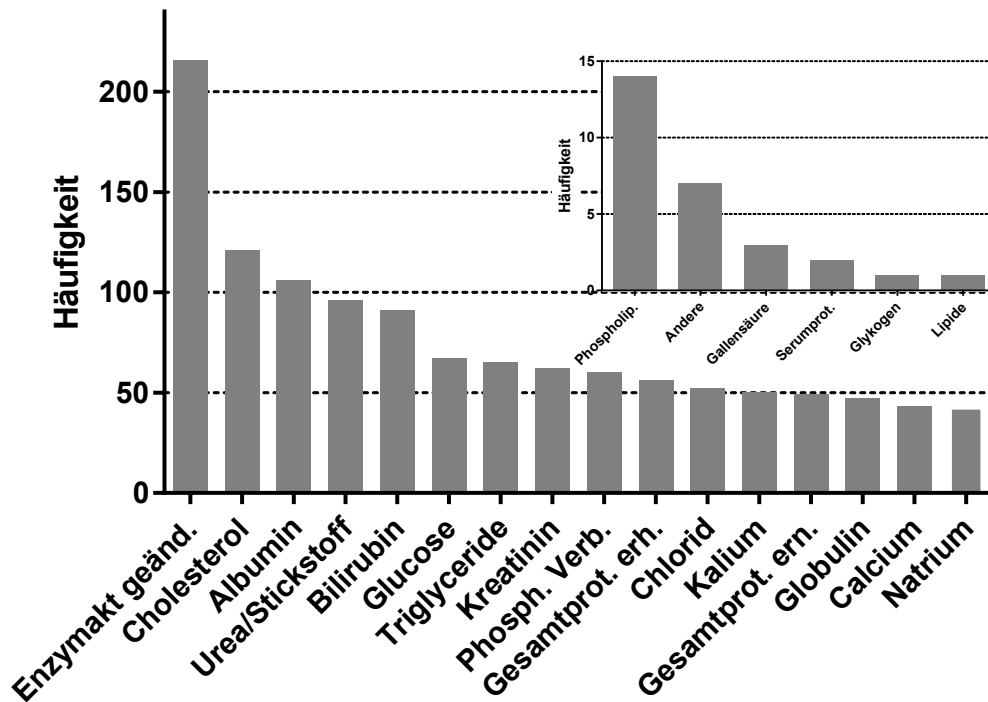


Abbildung 2.7.: Verteilung aller auftretenden Effekte in der klinischen Chemie. Zur besseren Übersicht werden Effekte, die seltener als 15 mal aufgetreten sind, separat als Insert dargestellt.

Die Verteilung der aufgetretenen Effekte bei den klinischen Symptomen verhält sich etwas gleichmäßiger und wird in Tabelle 2.7 und Abbildung 2.8 aufgelistet. Spitzenreiter mit 183 Effekten oder 15,1% ist der Futterkonsum, ein sehr unspezifischer Effekt, der nicht immer zwangsläufig auf die Behandlung der Tiere mit der Substanz zurückzuführen ist. Direkt hinter dem Futterkonsum folgt Hypersalivation mit 13,3%, ein ebenso unspezifischer Effekt. Es folgt ein relativ gleichmäßiger Abfall des Auftretens der Effekte über schlechten Allgemeinzustand, erhöhte Mortalität und gestäubtes Fell bis hin zu Atembeschwerden, anschließend sinkt die Häufigkeit langsamer. Ab dem Effekt der Zynaose liegt die Häufigkeit bei nur noch drei Malen, fällt also bei der Verteilung kaum noch ins Gewicht.

Tabelle 2.7.: Auflistung aller Effekte der klinischen Symptome in den vier Kategorien sehr häufig (≥ 70), häufig (≥ 30) gelegentlich (≥ 10) und selten (≤ 9).

sehr häufig	häufig	gelegentlich	selten
Futterkonsum (183)	Fellfärbung (61)	Lethargie (28)	Konvulsionen (9)
Salivation (161)	Wasseraufnahme (54)	Ataxie (19)	Hyperaktivität (7)
schlechter Allgemeinzustand (129)	unkoordinierte Bewegung (55)	abnormes Verhalten (19)	Andere (5)
Mortalität erhöht (97)	Fellverlust (49)	Diarrhöe (16)	verstärkte Reflexe (6)
gesträubtes Fell (87)	Hypoaktivität (49)	reduzierte Reflexe (16)	verschlossene Augen (6)
Atembeschwerden (70)	Fäzes (38)	Tremor (13)	Paralyse (6)
		Hypothermie (11)	Zyanose (3)
			Lakrimation (3)
			Schwellung (3)
			narkotische Effekte (2)
			Nasenirritation (2)
			Hyperthermie (1)
			Prostration (1)

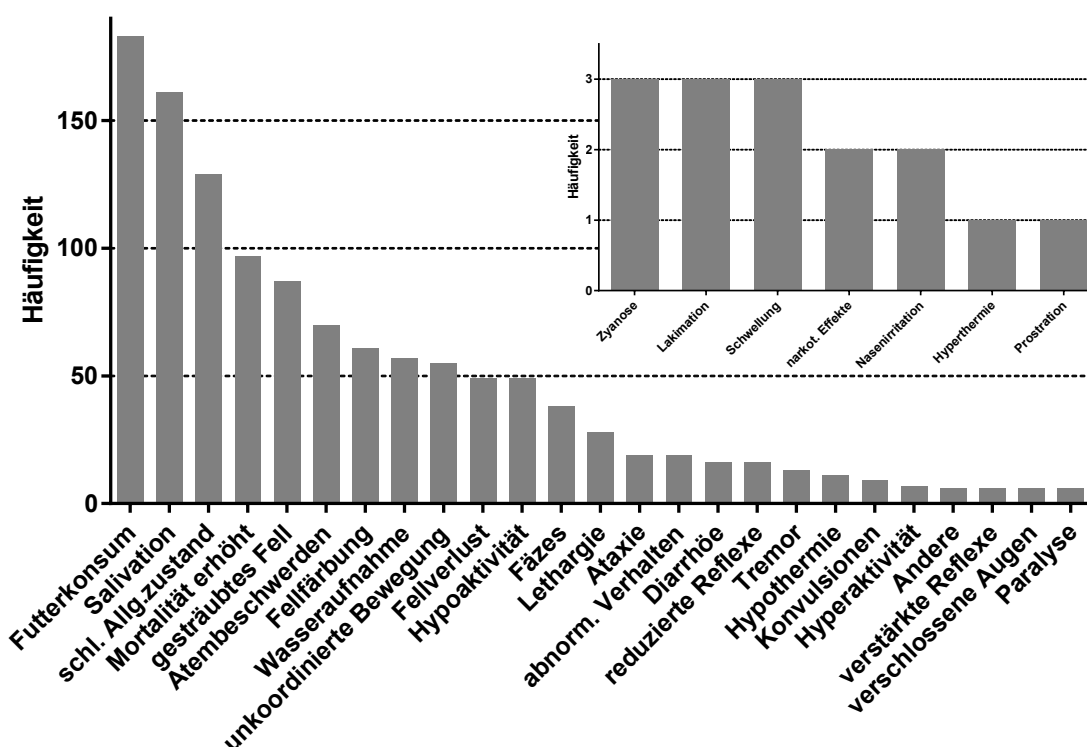


Abbildung 2.8.: Verteilung aller auftretenden Effekte der klinischen Symptome. Der Übersicht halber werden Häufigkeiten ≤ 3 separat in einem Insert dargestellt.

Die Leber ist insgesamt 663 mal betroffen. Die Verteilung wird in Tabelle 2.8 und Abbildung 2.9 wiedergegeben. Die Verteilung innerhalb der Leber selbst ist extrem ungleichmäßig. Wie aus der Tabelle und der Abbildung ersichtlich wird, zeigt sich eine deutliche Verschiebung der aufgetretenen Häufigkeiten zum erhöhten Lebergewicht und zum Teil zur Hypertrophie. Erhöhtes Gewicht, ein abermals eher unspezifischer Effekt, der auf vielerlei Gründe zurückzuführen ist und nicht pathogener Natur sein muss, ist dementsprechend mit 40,7% der mit Abstand am häufigsten auftretende Effekt, gefolgt von Hypertrophie mit nur noch 15,4% und einer Schwellung mit 5,1%. Bemerkenswert viele Effekte traten in all den Studien nur einmal bei der Leber auf, diese umfassen Zelledepletion, Cholestase, Zirrhose, Depletion, Fibrose, Hyperämie, Lipidose, Ödeme, Pyknose und regenerative Veränderungen innerhalb der Leber. Für weitere Aussagen treten diese Effekte deutlich zu selten auf.

Tabelle 2.8.: Auflistung aller Effekte auf die Leber in den Kategorien sehr häufig (≥ 100) häufig (≥ 8) gelegentlich (≥ 3) und selten (≤ 2).

sehr häufig	häufig	gelegentlich	selten
erhöhtes Gewicht (270)	Schwellung (34)	Plaques (7)	Atrophie (2)
Hypertrophie (102)	Zellvergrößerung (32)	Pigmentierung (7)	Foci (2)
	Vakuolisierung (31)	Andere (6)	Zelldepletion (2)
	Nekrose (28)	Glykogen (6)	Cholestase (1)
	Verfärbung (20)	Infiltration (6)	Zirrhose (1)
	erniedrigtes Gewicht (19)	Degeneratio adiposa (6)	Fibrose (1)
	eosinophile Strukturen (13)	Hämatopoese (5)	Hyperämie (1)
	Degeneration (11)	Zellstruktur geändert (5)	Lipidose (1)
	Organstruktur geändert (10)	Anschoppung (4)	Ödem (1)
	Inflammation (9)	Hyperplasie (4)	Pyknose (1)
		Enzymaktivität geändert (4)	regenerative Veränderungen (1)
		Hämosiderose (4)	
		Zellproliferation (4)	

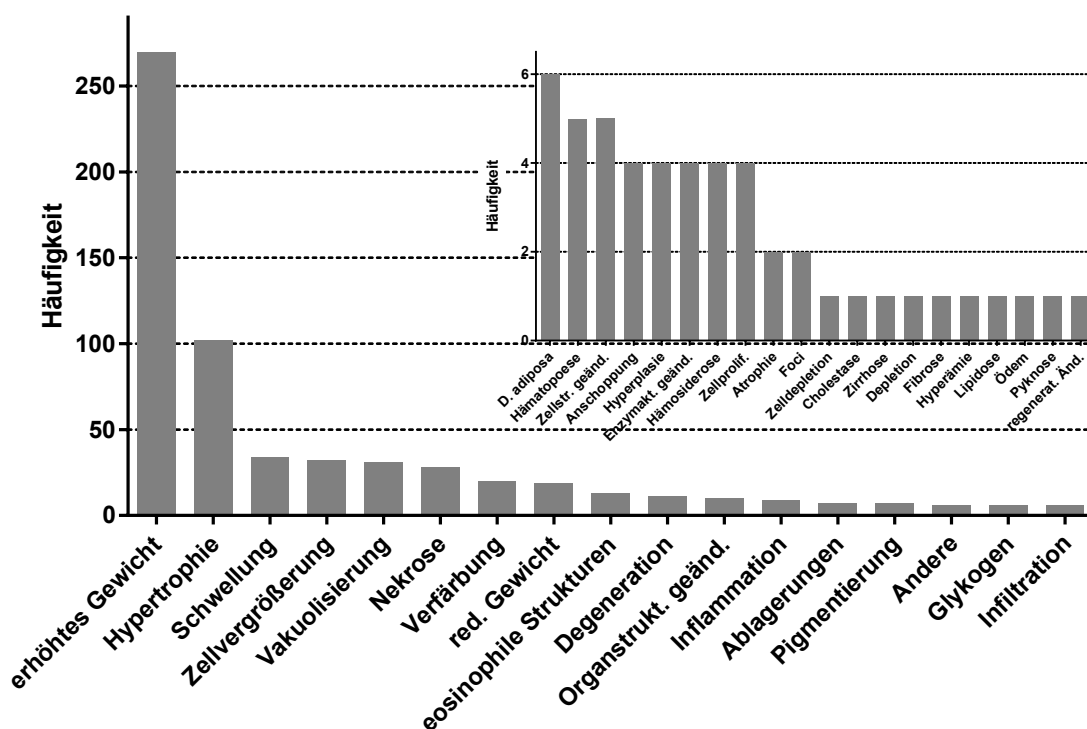


Abbildung 2.9.: Verteilung aller auftretenden Effekte auf die Leber. Häufigkeiten ≤ 6 werden gesondert im Insert des Diagramms aufgeführt.

Die Niere war in der gesamten Datenbank insgesamt von 455 Effekten betroffen. Tabelle 2.9 und Abbildung 2.10 stellen abermals Auflistung und Verteilung der Effekte auf das Organ dar. Noch mehr als bei der Leber sticht eine Verschiebung der Häufigkeiten auf einen Effekt, das erhöhte Gewicht, hervor. Dieser Effekt macht bei der Niere einen Anteil 34,7% aller Niereneffekte auf. Der zweithäufigste Effekt, die Basophilie, tritt nur noch zu 6,2% auf, das Gewicht war also fünf bis sechs mal so häufig betroffen. Ab der Basophilie ist der Abfall der Häufigkeiten relativ gleichmäßig verteilt, aber auch hier traten einige Effekte in der ganzen Datenbank nur ein einziges Mal auf.

Tabelle 2.9.: Auflistung aller Effekte auf die Niere in den Kategorien sehr häufig (158), häufig (≥ 11), gelegentlich (≥ 4) und selten (≤ 3).

sehr häufig	häufig	gelegentlich	selten
erhöhtes Gewicht (158)	Basophilie (28) Verfärbung (26) Dilatation (22) eosinophile Strukturen (21) Hyalin-Tropfen (21) erniedrigtes Gewicht (20) Degeneration (16) Schwellung (13) Nekrose (12) Nephropathie (12) Hyperplasie (11) Plaques (11) Pigmentierung (11)	Entzündung (9) regenerative Veränderungen (9) Andere (7) Vakuolisierung (6) Mineralisierung (6) Organstruktur geändert (6) Foci (4) Ödeme (4)	Hypertrophie (3) Infiltration (3) Zellstruktur geändert (3) Kalkablagerungen (2) funktionelle Störung (2) Nephrose (2) Anschoppung (1) Zysten (1) Fibrose (1) Hämosiderose (1) tubuläre Hyperbasophilie (1) Karyomegalie (1)

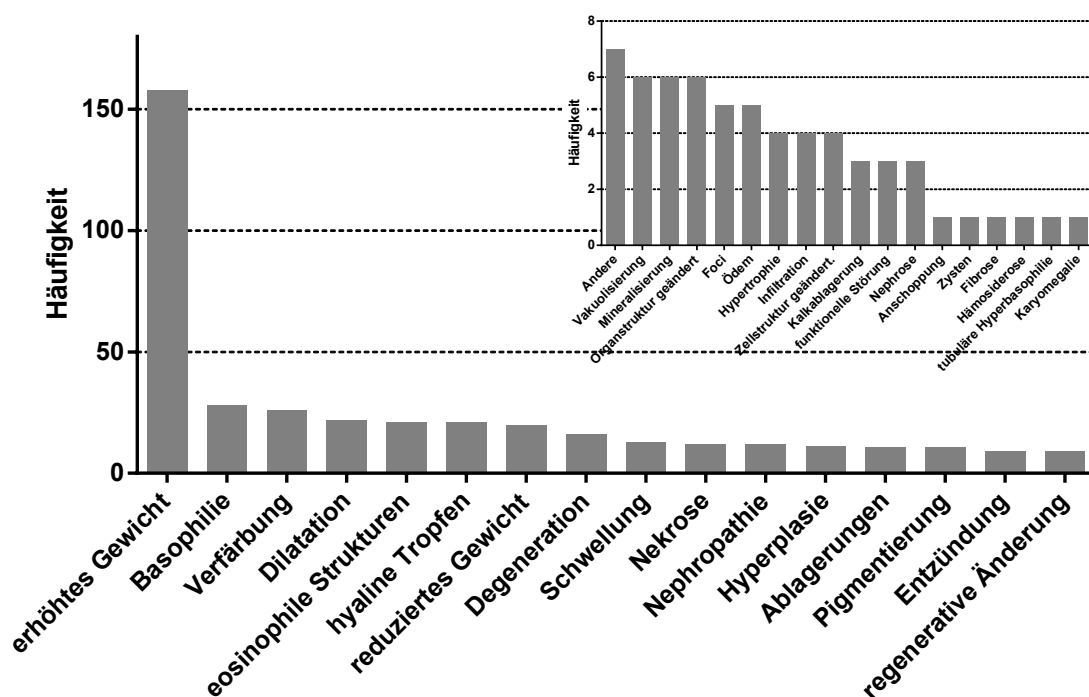


Abbildung 2.10.: Verteilung aller auftretenden Effekte auf die Niere. Effekte, die seltener als achtmal aufgetreten sind, werden gesondert als Insert des Diagramms dargestellt.

Tabelle 2.10 und Abbildung 2.11 zeigen die geänderten Enzymaktivitäten innerhalb der Leber, wie sie in der klinischen Chemie (Tabelle 2.6 und Abbildung 2.7) verzeichnet sind. Auch diese Zahlen fassen Erhöhungen und Erniedrigungen der Werte zusammen. Deutlich wird, dass insbesondere die Aminotransferasen (ALAT und ASAT) häufig betroffen waren, ebenso wie die alkalische Phosphatase (AP). Die γ -Glutamyltransferase (GGT) und insbesondere die Cholinesterase (ChE) sowie die Lactat-Dehydrogenase (LDH) waren vermindert betroffen.

Tabelle 2.10.: Auflistung der Enzymaktivität der Leber (ALAT = Alanin-Aminotransferase, AP = alkalische Phosphatase, ASAT = Aspartat-Aminotransferase, GGT = γ -Glutamyltransferase, ChE = Cholinesterase, LDH = Lactat-Dehydrogenase).

ALAT	AP	ASAT	GGT	ChE	LDH
178	141	122	40	5	2

Eine genaue Auswertung der in der Datenbank hinterlegten Enzymwerte ist nicht möglich, da quantitative Angaben fehlen. So berücksichtigt die Maske der Datenbank lediglich die Information, dass Enzymwerte erhöht oder erniedrigt waren, nicht aber

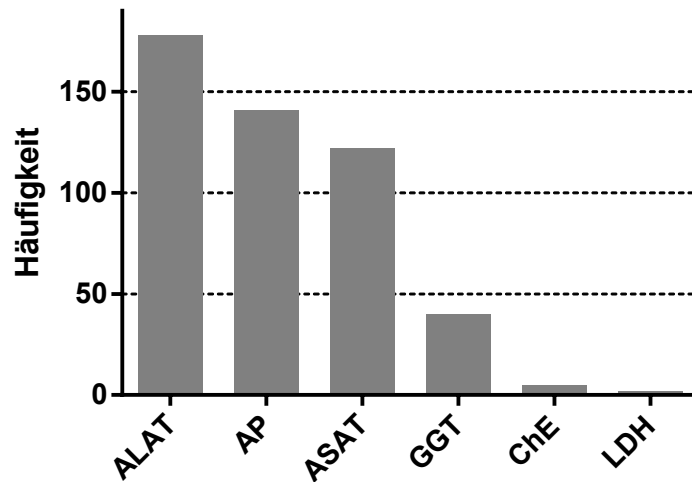


Abbildung 2.11.: Verteilung der Enzymaktivität (ALAT = Alanin-Aminotransferase, AP = alkalische Phosphatase, ASAT = Aspartat-Aminotransferase, GGT = γ -Glutamyltransferase, ChE = Cholinesterase, LDH = Lactat-Dehydrogenase).

wie stark sie von der Norm abweichen und ob es sich vielleicht sogar nur um natürliche Schwankungen handelt. Allerdings lieferten auch die toxikologischen Befunde aus dem Archiv des BfR keine detaillierteren Informationen, um sie mit Referenzwerten wie in Tabelle 2.11 zu vergleichen.

Tabelle 2.11.: Auflistung der Referenzwerte für den Menschen für die Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT), alkalische Phosphatase (AP) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) in U/L. Nach IFCC-Methode mit Pyridoxalphosphat. Nach [29], ¹zum Vergleich Referenzwerte nach [30]

	ALAT	ASAT	AP	GGT
Männer	10 - 50	10 - 50	40 - 129	10 - 66
	< 50 ¹	< 59 ¹		< 40 ¹
Frauen	10 - 35	10 - 35	35 - 104	5 - 39
	< 35 ¹	< 35 ¹		< 60 ¹

Eine allgemeine Beobachtung aller Studien zeigt, dass adverse Effekte in allen Organen auftraten. Dies ist nicht weiter verwunderlich, gehören die verzeichneten Chemikalien doch keiner spezifischen Stoffgruppe an, sondern bilden ein weitestgehend gestreutes Feld verschiedenster Chemikalien mit unterschiedlichen Effekten. Hier wäre

es sicherlich sinnvoll, eine Kategorisierung an strukturell ähnlichen Stoffen zu treffen und diese erneut hinsichtlich ihrer Effekte auf die Organe zu analysieren. Denn trotz der breit gefächerten Effekte auf die verschiedensten Organe bleibt doch festzuhalten, dass deren Häufigkeit sehr ungleichmäßig verteilt ist. Die klinische Chemie war am häufigsten betroffen. Hier trat besonders die Enzyminduktion hervor. Klinische Symptome hatten die meisten Effekte nach der Chemie zu verzeichnen. Allerdings fallen unter klinische Symptome zahlreiche Effekte wie gestäubtes Fell, Salivation oder veränderter Futterkonsum, die sehr unspezifisch sind und daher nicht zwangsläufig in direktem Bezug zur Behandlung stehen.

Nicht nur die Verteilung der Effekte auf die Organe, auch die Effekte innerhalb eines Organs zeigen ähnliche Häufigkeiten. In den Studien mit 28 und 90 Tagen Behandlungsdauer waren beinahe alle Effekte vertreten, wenngleich mit stark unterschiedlicher Häufigkeit. Grundsätzlich traten auch hier unspezifische Effekte am häufigsten auf. Die Leber war das dominante toxikologische Zielorgan. Das Gewicht der Leber war dabei der mit Abstand sensitivste Indikator, wobei auch dieser Effekt sehr unspezifisch ist. Die veränderte Enzymaktivität aus der klinischen Chemie zeigt zudem sehr häufig variierte Aktivitäten der Transaminasen wie Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT). Darüber hinaus zeigte die alkalische Phosphatase (AP) veränderte Aktivität. Ähnliche Zielorgane mit vergleichbaren Effekten, wenn auch mit chronischer Studiendauer, wurden in einer Studie der EFSA festgestellt [31]. In dieser Studie wurden Kategorisierungen für Effekte unter Verabreichung von Triazolen vorgenommen. Dabei konnten den verschiedenen Triazolen gezielte Organefekte zugeordnet werden. Eine solche Kategorisierung wäre für die Neustoff-DB auch sinnvoll, sofern hinreichend viele strukturverwandte Stoffgruppen in der Datenbank verzeichnet sind.

2.3.3. Vergleich zwischen RepDose und Neustoff-DB

2.3.3.1. Studien-Vergleiche

In diesem Abschnitt wird die RepDose-Datenbank mit Stoffen des Fraunhofer Instituts für Toxikologie und experimentelle Medizin (ITEM) mit der Neustoff-Datenbank mit Stoffen des BfR im direkten Vergleich gegenübergestellt.

Hierzu werden zum einen charakteristische physikochemische Aspekte, wie Molekulargewicht, Wasserlöslichkeit, Dampfdruck und logP, verglichen, zum anderen Datencharakteristika wie die Verteilung der betroffenen Organe.

Hierbei ist zu erwähnen, dass die Datenbank vom Fraunhofer ITEM aktuell 622 verschiedene Chemikalien enthält, die in 1877 Studien erfasst wurden. Versuchstiere

2. Erstellung ELINCS-Datenbank

waren nicht nur Ratten, wie bei den Daten des BfR, sondern darüber hinaus auch Mäuse und Hunde, denen die Stoffe oral oder inhalativ verabreicht wurden. Beim BfR wurden hingegen nur orale Studien für die Datenbank verwendet. Die Datenbank wurde 2006 entwickelt und wächst seitdem stetig in ihrem Umfang.

Auffällig ist zunächst der deutlich höhere Umfang an Studien zu den Chemikalien. Während den nur 622 Chemikalien des ITEM 1877 Studien gegenüberstehen, wurden zu den 878 Chemikalien der Neustoffdatenbank des BfR lediglich 896 Studien berücksichtigt. Zum größten Teil der Stoffe des BfR wurde also nur eine einzige Studie in die Datenbank eingetragen, wohingegen beim ITEM bis zu 15 Studien pro Stoff erfasst wurden.

Tabelle 2.12 zeigt eine Übersicht der Dauern der in den Datenbanken verzeichneten Studien. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in der RepDose nicht nur subakute und subchronische Studien registriert sind, sondern auch chronische Studien. Auffällig ist zudem, dass der überwiegende Teil der Neustoff-DB aus subakuten Studien mit einer Dauer von 28 Tagen bestehen. Bei der RepDose sind die Studiendauern relativ gleichmäßig verteilt. Am häufigsten sind jedoch subchronische Studien im Bereich von 90 Tagen vertreten, gefolgt von chronischen Studien mit Zeiträumen von über einem Jahr, die in der Neustoff-DB gar nicht vertreten sind.

Tabelle 2.12.: Gegenüberstellung der in beiden Datenbanken verzeichneten Studiendauern.

Studien- dauer	Kurzzeit	subakut	Kurzzeit	subchronisch	subchronisch	chronisch
	1		2		- chronisch	
Bereich in RepDose	< 23 d	23 - 31 d	32 - 82 d	83 - 98 d	99 - 364 d	≥ 365 d
Neustoff- DB	5	741	1	95	-	-
RepDose	172	187	109	331	108	283

Eine übersichtliche Darstellung über allgemeine Studieneigenschaften der Datenbanken ist in Tabelle 2.13 enthalten. Die Tabelle enthält zum einen Häufigkeiten der verwendeten Versuchstiere in Anzahl der Substanzen und Anzahl der Studien, in denen die Tiere verwendet wurden. Der Schwerpunkt wurde in beiden Datenbanken auf Versuchen mit Ratten gesetzt. Insbesondere die Neustoff-DB enthält fast ausschließlich Ratten als Versuchstiere. Andere Spezies wurden vernachlässigbar selten aufgeführt. Vierundzwanzig Substanzen in der Neustoff-DB enthielten keine Angaben über die verwendete Spezies. Die RepDose setzt hingegen ausschließlich auf Ratten und Mäuse.

2. Erstellung ELINCS-Datenbank

Zwar wurden auch hier weitaus mehr Ratten als Mäuse verwendet, aber die Unterschiede fallen nicht so gravierend aus wie in der Neustoff-DB.

Darüber hinaus enthält die Tabelle Informationen über die Expositionswege. Anders als in Tabelle 2.5 unterscheidet diese Tabelle nicht zwischen verschiedenen oralen Expositionswegen. Tabelle 2.13 fasst Studien mit Exposition über Magensonde, Futter oder Trinkwasser unter dem Überpunkt „oral“ zusammen. Wieder setzt die Neustoff-DB den Schwerpunkt auf nur einen Expositionsweg, den der oralen Verabreichung. Auch bei der RepDose nehmen Studien mit oraler Exposition den größten Teil ein, aber etwa 25 % der Studien sind per inhalativer Verabreichung durchgeführt worden.

Tabelle 2.13.: Gegenüberstellung der in beiden Datenbanken verzeichneten Studien mit Tieren und Expositionsangaben.

	RepDose		Neustoff-DB	
	Substanzen	Studien	Substanzen	Studien
Alle	622	1877	877	896
Ratte	607	1349	804	850
Maus	296	527	5	7
Hund	0	0	9	11
Kaninchen	0	0	2	2
keine Angabe	0	0	24	24
Oral	503	1262	792	834
Inhalativ	262	615	16	22
Keine Angabe	0	0	9	34
dermal	0	0	2	4

Die erste Abbildung stellt den Vergleich der beiden Datenbanken bezüglich der Anzahl der Chemikalien dar, die Effekte in den entsprechenden Organen hervorgerufen haben (Abbildung 2.12). Auffällig ist, dass die Verteilung der am häufigsten betroffenen Organe ähnlich ist. Die sensibelsten Organe und Parameter in der RepDose sind Körpergewicht, Leber, klinische Symptome, Niere und Hämatologie, während die Neustoff-DB des BfR am häufigsten klinische Chemie, klinische Symptome, Leber, Hämatologie und Körpergewicht enthält. Hierbei fällt besonders der markante Unterschied in der Häufigkeit der Chemikalien auf, die Veränderungen bei klinisch-chemischen Parametern verursachen. Während in der Neustoff-DB etwa 520 Chemikalien Effekte auf die klinische Chemie ausübten, konnten in der RepDose lediglich etwa 270 Stoffe verzeichnet werden, die die klinische Chemie beeinträchtigten. Sicherlich ist der Vergleich absoluter Zahlen hierbei schwierig, da die Gesamtzahlen der erfassten Stoffe in beiden Datenbanken stark variieren, aber der Unterschied ist dennoch auffällig.

Im weiteren Verlauf der Häufigkeitsverteilung beider Datenbanken ist auffällig, dass die Verteilung der RepDose relativ gleichmäßig abnimmt, wohingegen die Zahlen für die betroffenen Organe der Neustoff-DB ungleichmäßig verringert werden. Darüber hinaus sind in der RepDose alle Organe merklich betroffen. Bei den Effekten der Neustoff-DB sind einzelne Organe gar nicht betroffen.

Ein Vergleich der betroffenen Organe in Abhängigkeit von der Anzahl der Chemikalien aus Abbildung 2.12 mit den betroffenen Organen in Abhängigkeit von der Anzahl aufgetretener Effekte insgesamt aus Abbildung 2.6 zeigt auch eine ähnliche Verteilung. Der Vergleich kann jedoch aufgrund fehlender Daten der RepDose nur mit der Neustoff-DB vorgenommen werden. Wie schon am Anfang von Abschnitt 2.3.1 aufgeführt, sind die fünf am häufigsten von Effekten betroffenen Organe und Parameter die klinische Chemie, klinische Symptome, Hämatologie, Leber und Niere. Die Reihenfolge ist fast deckungsgleich mit der in Abbildung 2.6. Hier sind Leber und Hämatologie vertauscht und die Niere wird vom Körpergewicht auf dem fünften Platz verdrängt. Auch die weitere Verteilung bei beiden Diagrammen ist vergleichbar. Größere Differenzen treten erst auf, nachdem die Häufigkeiten der betroffenen Organe bzw. aufgetretenen Effekte so weit gesunken sind, dass die Differenzen untereinander marginal sind und die Aussagekraft dementsprechend abnimmt.

Abbildung 2.12 stellt ebenso wie Abbildung 2.13 den Vergleich beider Datenbanken hinsichtlich der Anzahl der Chemikalien dar, die Effekte in den Organen hervorgerufen haben. Allerdings werden die Substanzen hier in relativen Zahlen angegeben mit einer Signifikanzdarstellung. Auch hier sind die häufigsten Zielorgane in beiden Datenbanken gleich mit klinischen Befunden, klinischer Chemie, Hämatologie, Körpergewicht, Leber, Niere und Milz. Abgesehen davon weisen aber fast alle Organe hochsignifikante (χ^2 -Test) Unterschiede in den Häufigkeiten auf. Dabei sind die Zielorgane der RepDose relativ betrachtet immer häufiger betroffen als die der Neustoff-DB, abgesehen von der klinischen Chemie. Hier treten die Häufigkeiten signifikant genau andersherum auf.

Besonders markante Unterschiede werden bei der Anzahl der Chemikalien, die die Lunge und die Nase betreffen ersichtlich. Die Lunge ist in der RepDose-DB etwa viermal so häufig betroffen wie in der Neustoff-DB. Bei der Nase fällt der Unterschied noch deutlich gravierender aus, gleiches gilt für die Augen. Dies ist im Wesentlichen vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein großer Teil der Studien des Fraunhofer ITEM inhalative Verabreichungswege aufzeigten, die natürlich eine wesentlich höhere Exposition der drei betroffenen Organe bedeuten, als bei den fast ausschließlich oralen Studien des BfR.

Weiter auffällig sind die Zielorgane Drüsen, wozu Mammadrüse und Hypophyse gehören. In den Studien der Neustoff-DB waren diese Organe praktisch gar nicht betroffen,

wohingegen sie in der RepDose vergleichsweise häufig betroffen waren. Gleiches gilt für die Hoden, die in der RepDose deutlich häufiger betroffen waren als in der Neustoff-DB. Dies ist auf die Studiendauer zurückzuführen. Während in der Neustoff-DB hauptsächlich kurze Studiendauern im subakuten Bereich durchgeführt wurden, liegen in der RepDose zum größten Teil subchronische und chronische Studien vor, wie schon in 2.12 beschrieben. Die hier erwähnten Organe sind typische Organe für Tumorentwicklung. Die 28-Tage Tests der Neustoff-DB waren zu kurz, als dass sich Tumore hätten entwickeln können. Bei den chronischen und subchronischen Studien der RepDose ist dies hingegen möglich.

2. Erstellung ELINCS-Datenbank

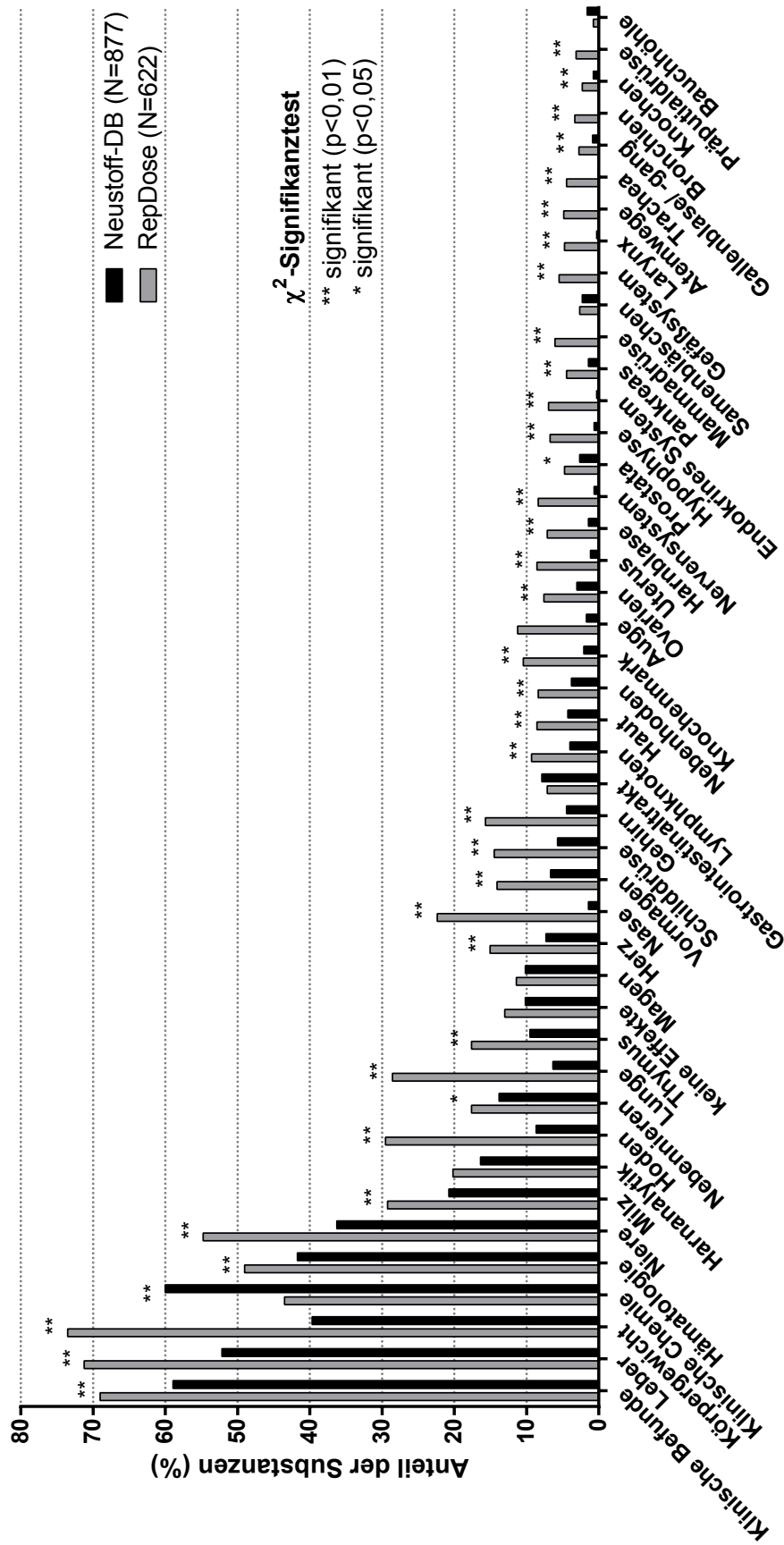


Abbildung 2.13.: Ein Vergleich der Zielorgane zwischen RepDose und Neustoff-DB in relativen Zahlen mit Signifikanzdarstellung. Dargestellt sind sämtliche betroffene Organe der Häufigkeit nach geordnet mit der entsprechenden Anzahl der Chemikalien bis zum Organ Bauchhöhle. Die weiteren Organe sind nicht bemerkenswert häufig betroffen und der Übersicht halber nicht dargestellt.

2.3.3.2. Physikochemische Daten

Im Folgenden sollen die grundlegenden wichtigsten physikalisch-chemischen Parameter der in beiden Datenbanken abgelegten Stoffe miteinander verglichen werden. Abbildung 2.14 zeigt die Gegenüberstellung der Molekulargewichte aller verzeichneten Substanzen beider Datenbanken.

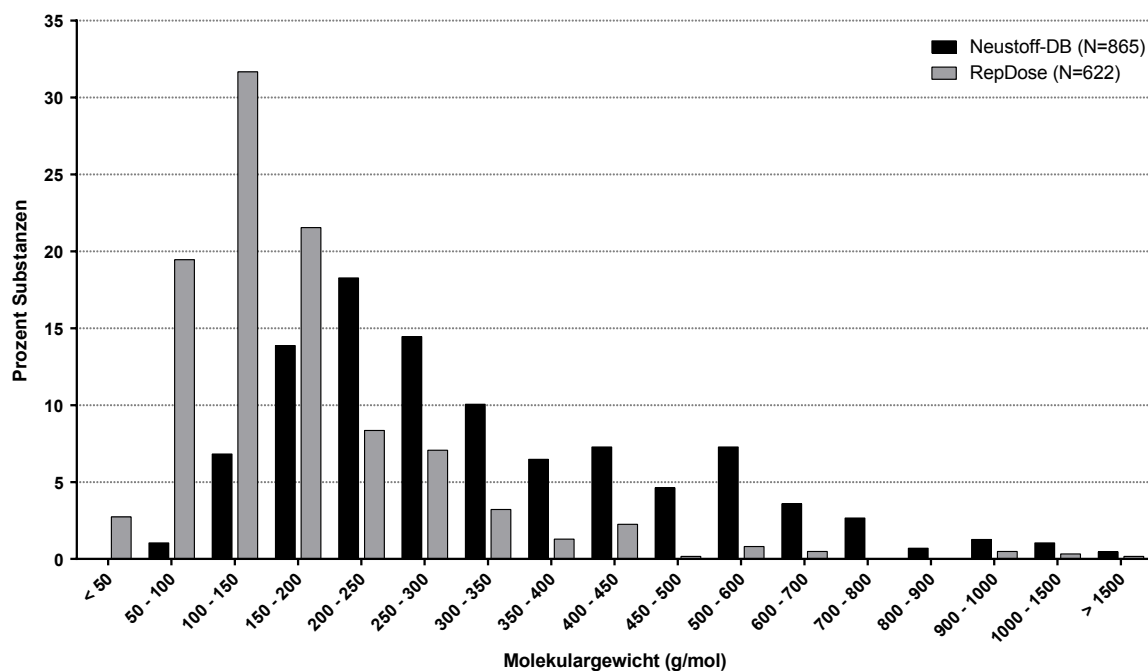


Abbildung 2.14.: Ein Vergleich der Molekulargewichte aller Substanzen beider Datenbanken in relativen Zahlen. Die Stoffe wurden in Gewichtskategorien eingeteilt, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten.

Während der Großteil der Stoffe aus der RepDose-Datenbank des ITEM überwiegend im niedermolekularen Bereich von 50 bis 200 g/mol angesiedelt ist, ist die Verteilung der Substanzen der Neustoff-Datenbank gleichmäßiger. Zwar liegt auch hier der Großteil der Substanzen im niedermolekularen Bereich von 100 bis 300 g/mol, allerdings fällt die Anzahl betroffener Substanzen in höheren Molekulargewichten nicht so schnell ab wie bei der RepDose. So fällt die Anzahl der Substanzen ab einem Molekulargewicht von 300 g/mol schon auf unter 20 (3,2 %) in der RepDose, die gleiche Anzahl (entspricht 2,3 %) wird bei der Neustoff-DB allerdings erst ab einem Molekulargewicht von 800 g/mol erreicht. Insgesamt sind die Substanzen der Neustoff-DB gleichmäßiger über alle Molekulargewichtsklassen verteilt.

Abbildung 2.15 listet die Verteilung der Dampfdrücke beider Datenbanken in Kategorien aufgeteilt auf. Zunächst fällt eine deutliche Verlagerung der Dampfdrücke zwischen

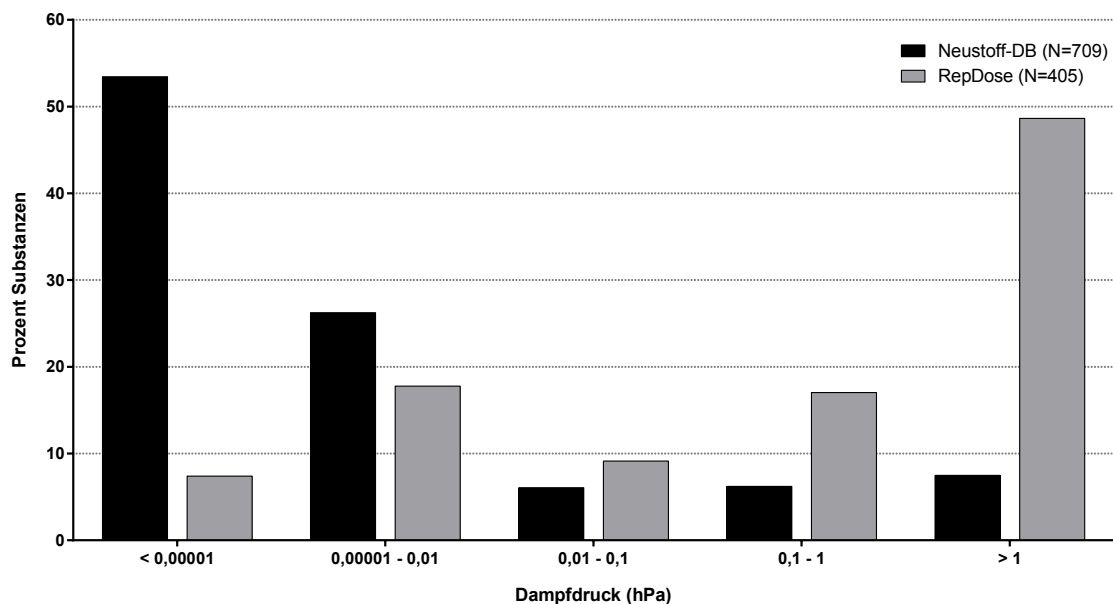


Abbildung 2.15.: Ein Vergleich des Dampfdrucks aller Substanzen beider Datenbanken. Die Stoffe wurden in Kategorien eingeteilt, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten.

beiden Datenbanken auf. Die Dampfdrücke der Neustoff-DB siedeln sich überwiegend im unteren Bereich mit etwa 380 Substanzen bis $1 \cdot 10^{-5}$ hPa und knapp 200 Substanzen bis 0,01 hPa an. Dies entspricht bereits über 80 % der Stopffe der Datenbank. Der weitaus größte Teil der Substanzen der RepDose findet sich am anderen Ende der Skala mit Drücken über einem hPa bezogen auf knapp 200 Substanzen (knapp 50 %). Weniger als 10 % aller Substanzen beider Datenbanken finden sich im Dampfdruck-Bereich von 0,01 bis 0,1 hPa. Aus diesen Werten lässt sich erkennen, warum bei vielen Substanzen der Neustoff-DB keine Studien inhalativer Exposition gefordert waren, wohingegen inhalative Verabreichungen bei der RepDose mit den vergleichsweise hohen Dampfdrücken auch entsprechend häufiger durchgeführt wurden. Hierbei ist zu beachten, dass in der Neustoff-DB etwa zu etwa 80 % der Stoffe Daten zum Dampfdruck vorlagen, während dies in der RepDose nur für 65 % der Stoffe zutrif.

Der nächste erläuterte physikochemische Parameter ist die Löslichkeit der Substanzen. Abbildung 2.16 stellt die Löslichkeit der Stoffe beider Datenbanken gegenüber. Während die Löslichkeit der Stoffe in der Neustoff-DB relativ gleichverteilt über die einzelnen Kategorien ist, mit einem leichten Trend zu schwerlöslichen (<0,1 mg/l) und schlecht löslichen (0,1 mg/l bis 100 mg/l) Verbindungen, zeigen die Stoffe der RepDose eine Tendenz zu moderat löslichen bis mischbaren Stoffen (>100 mg/l) auf. Letztere Datenbank enthält vergleichsweise wenige Einträge von Substanzen mit einer

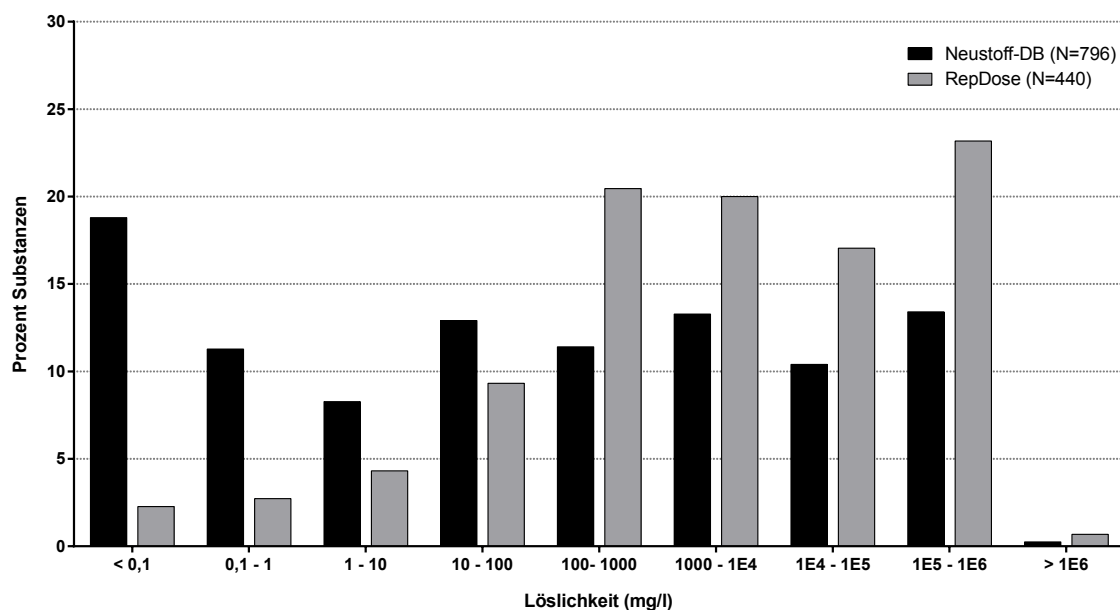


Abbildung 2.16.: Ein Vergleich der Löslichkeit aller Substanzen beider Datenbanken. Die Stoffe wurden in Kategorien eingeteilt um eine bessere Übersicht zu gewährleisten.

Löslichkeit von bis zu 10 mg/l. Bei höheren Löslichkeiten nimmt die Anzahl betroffener Substanzen bis zu einer Löslichkeit von $1 \cdot 10^6$ mg/l zu. Bemerkenswert ist zudem, dass die Kategorie unter 0,1 mg/l bei der Neustoff-DB mit etwa 150 Substanzen (19%) den größten Anteil hat.

Auch bei diesem physikochemischen Parameter gibt es also gravierende Unterschiede in den Verteilungen beider Datenbanken.

Beim Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P$ aus Abbildung 2.17, also dem Modellmaß für das Verhältnis zwischen Lipophilie und Hydrophilie einer Substanz, ist eine relativ hohe Übereinstimmung zwischen beiden Datenbanken zu erkennen. Während die Verteilung der Neustoff-DB in dieser Kategorisierung weitestgehend einer Gauß-Verteilung entspricht, zeigt die RepDose eine leichte Rechtsverschiebung mit Substanzen, die einen $\log P$ hauptsächlich im positiven Bereich aufweisen. Beide Datenbanken haben im Bereich von 0 bis 4 die meisten Substanzen verzeichnet. Allerdings nimmt die Anzahl der Substanzen der RepDose ab einem Wert von 4 wieder rapide ab, während gut 10% der Stoffe der Neustoff-DB noch einen $\log P$ von > 6 aufweisen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Neustoff-DB beinahe doppelt so viele Werte zum $\log P$ enthält wie die RepDose des ITEM.

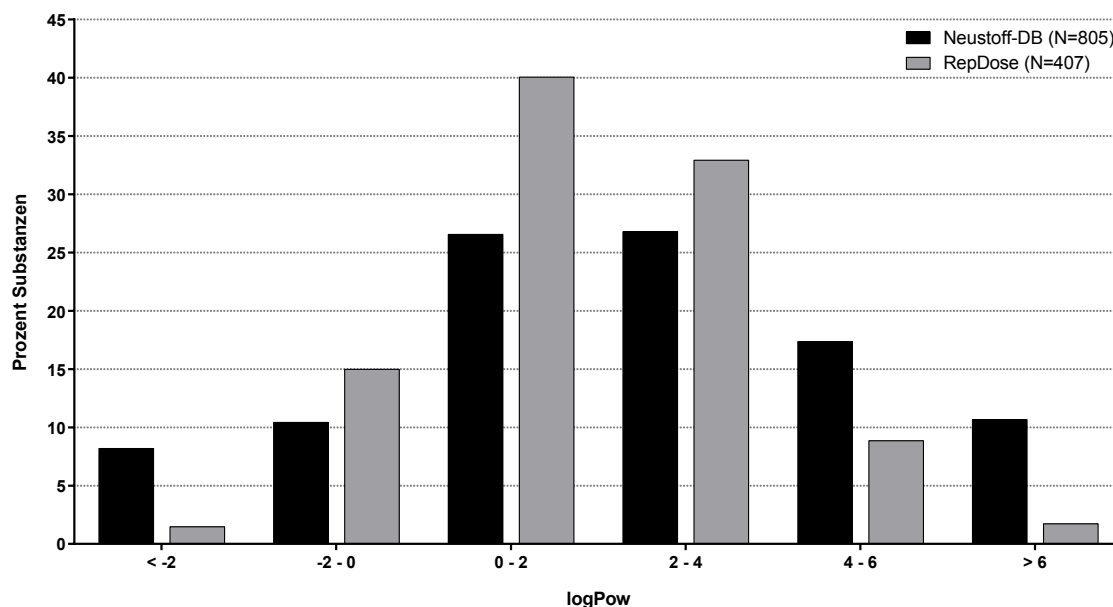


Abbildung 2.17.: Ein Vergleich des logP aller Substanzen beider Datenbanken. Die Stoffe wurden in Kategorien eingeteilt, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten.

2.3.3.3. Effect Levels

Dieser Abschnitt befasst sich mit den *Effect Levels* der Substanzen. Im Einzelnen werden also der *No Observed Effect Level* (NOEL) (Abb. 2.18) und der *Lowest Observed Effect Level* (LOEL) (Abb. 2.19) detailliert erläutert.

Ein Vergleich der NOELs beider Datenbanken zeigt, dass der größte Anteil der Substanzen beider Datenbanken im Bereich von 0,01 bis 10 mmol/kg bw/d liegt (Neustoff-DB > 90 %, RepDose > 80 %). In der RepDose finden sich zusätzlich ca. 10 % der Substanzen im Bereich von 0,001 bis 0,01 mmol/kg bw/d. Zudem sind bei der RepDose auch noch Stoffe bis 1000 mmol/kgbw/d gelistet, die in der Neustoff-DB nicht zu finden sind. Im Bereich < 0,01 mmol/kg bw/d ist die Verteilung unauffällig.

Auch die LOELs fallen bei beiden Datenbanken weitestgehend identisch aus. Beide Datenbanken enthalten die meisten Werte im Bereich von 0,01 bis 10 mmol/kg bw/d. Werte außerhalb dieser Spanne fallen kaum ins Gewicht. Dennoch fällt auf, dass die RepDose mehr Stoffe enthält, deren LOELs kleiner als 0,01 mmol/kg bw/d sind, wohingegen die Neustoff-DB in diesen Bereichen extrem wenige Stoffe zu verzeichnen hat. Gleiches gilt für Werte ab 10 mmol/kg bw/d. Insgesamt verteilen sich die LOELs der RepDose auf einem größeren Raum, wenngleich das Gros der Substanzen in beiden Datenbanken im mittleren Bereich auftritt.

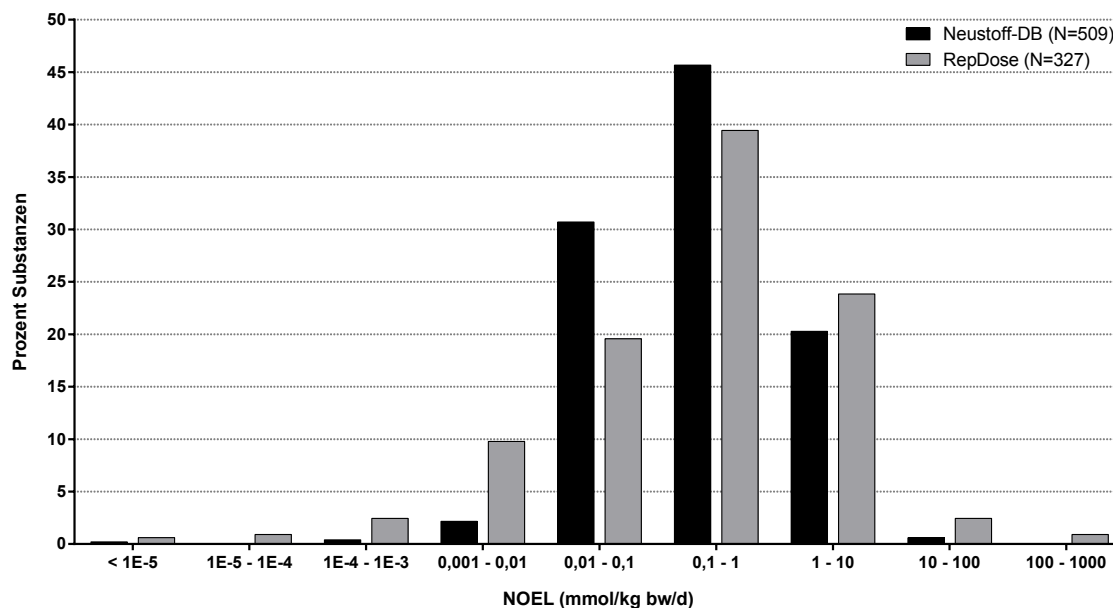


Abbildung 2.18.: Ein Vergleich der NOELs aller Substanzen beider Datenbanken. Die Stoffe wurden in Kategorien eingeteilt, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten.

Die Gegenüberstellung und der Vergleich der Datenbanken RepDose und Neustoff-DB ergab interessante Ergebnisse, die erkennen lassen, inwieweit beide Datenbanken einen ähnlichen Raum in der Welt der Chemikalien abdecken. Von den physikochemischen Daten her bewertet sind die Unterschiede des Molekulargewichts nicht ausgeprägt und für QSAR-Belange nicht relevant. Das gleiche gilt für den Parameter Dampfdruck. Die Verteilung des logP ist nahezu übereinstimmend, jedoch ist die Löslichkeit eines großen Anteils von Chemikalien der Neustoff-DB sehr gering (unter 0,1 mg/l). Aus dem Befund einer geringen Wasserlöslichkeit lässt sich schließen, dass die Bioverfügbarkeit wahrscheinlich niedrig ist. Im Vergleich der NOELs und LOELs von Neustoff-DB gegenüber der RepDose wird erkennbar, dass die Werte im Mittel etwa gleich sind und sich insofern die geringere Wasserlöslichkeit der Substanzen aus der Neustoff-DB offensichtlich nicht auf die Effektlevel auswirkt.

Im Vergleich der Zielorgane bzw. Zieleffekte sind bemerkenswerte, auch statistisch signifikante, Unterschiede in den beiden Datenbanken zu erkennen. Diese Unterschiede des Effektspektrums können möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass die Studiendauer in der Neustoff-DB überwiegend bei 23 bis 32 Tagen (88 %) lag, wobei eine längere Studiendauer von über 32 Tagen für 70 % der Stoffe aus RepDose vorliegt. Damit ist klar, dass der Untersuchungsumfang der Stoffe in der RepDose-Datenbank

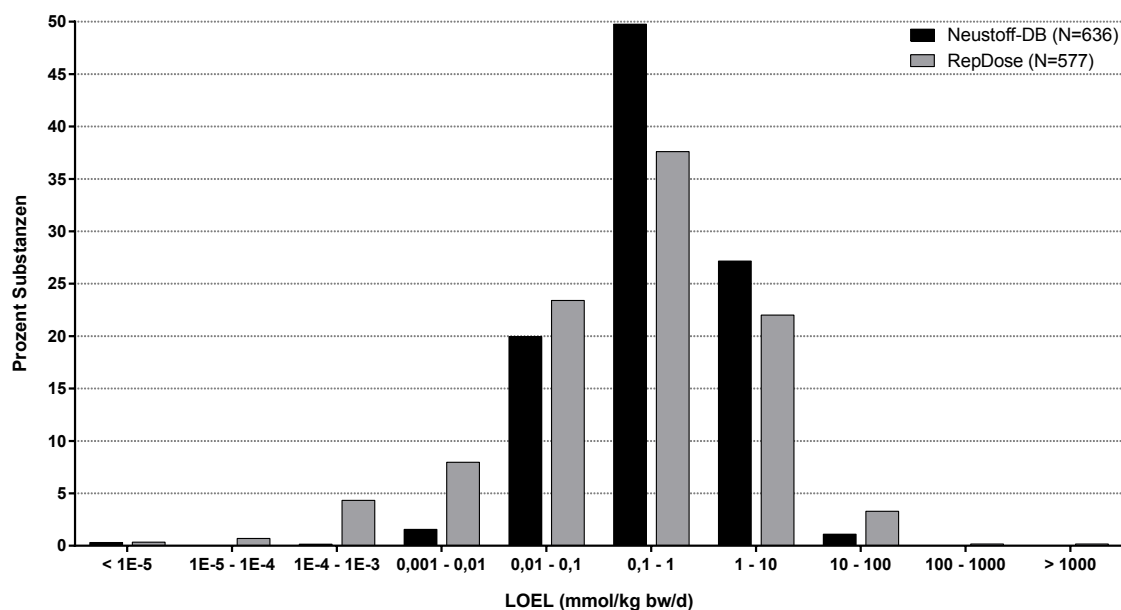


Abbildung 2.19.: Ein Vergleich der LOELs aller Substanzen beider Datenbanken. Die Stoffe wurden in Kategorien eingeteilt, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten.

deutlich größer war, als der Untersuchungsumfang der Neustoff-DB. Insofern sind die Unterschiede der Datenbanken nachvollziehbar.

Die NOEL- und LOEL-Werte der beiden Datenbanken zeigen vergleichbare Verteilungen und lassen ähnliche Verteilungsparameter erwarten.

2.3.3.4. Zusammenhang physikochemische Parameter und Toxizität

Molekulargewicht und Toxizität Das Molekulargewicht der Stoffe reicht von 32 bis 1297 g/mol (Abb. 2.20). Ein Großteil der Stoffe häuft sich in einem Bereich von etwa 50 bis 350 g/mol. Nach dem Calinski&Harabasz-Kriterium wurde der *Best Split* für Werte $\leq 399,3$ ermittelt. Demnach liegen 730 Stoffe unterhalb des *Best Split* und 169 Stoffe oberhalb. Ein Split bei der Toxizität wurde bei dem Wert 10 festgelegt. Stoffen mit einem Wert > 10 wird demnach eine hohe Toxizität zugewiesen, Stoffe ≤ 10 gelten als gering toxisch. Im Bereich des höheren Molekulargewichts wurde somit 14 von 169 Stoffen eine hohe Toxizität zugewiesen ($14/169 = 0,08$), bei den Stoffen im Bereich des unteren Molekulargewichts wurden 186 von 730 Chemikalien eine hohe Toxizität zugewiesen ($186/730 = 0,26$).

Im unteren Molekulargewicht bis einschließlich 399,3 g/mol wurde ein Anteil von 26 % der Stoffe als hoch toxisch eingestuft. Im Bereich des höheren Molekulargewichts $> 399,3$ g/mol wurden lediglich 8 % der Stoffe mit einer hohen Toxizität bewertet.

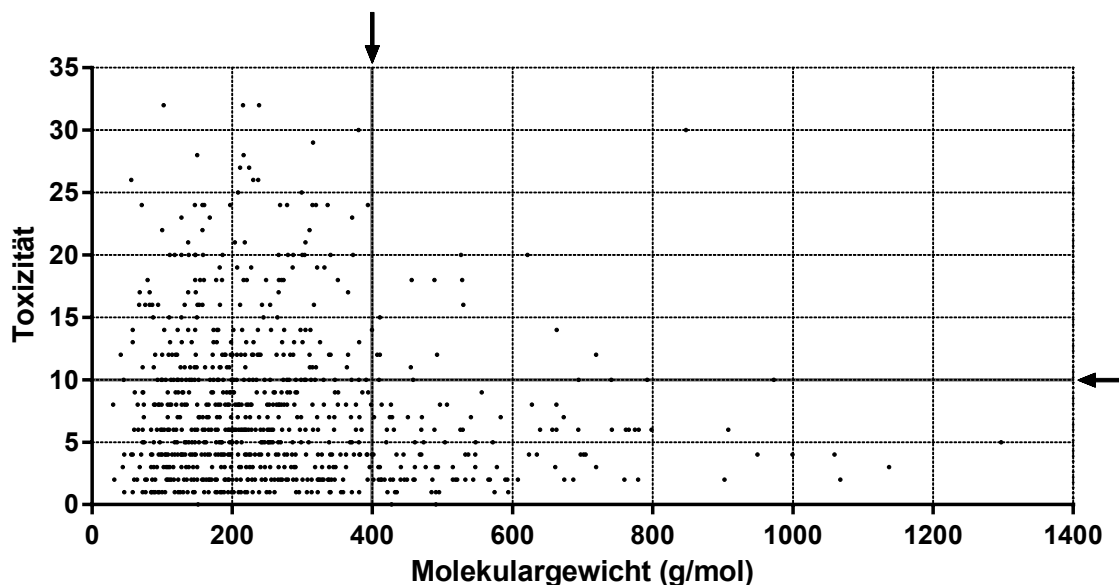


Abbildung 2.20.: Verhältnis des Molekulargewichts der Stoffe gegenüber der Toxizität. Die graue Markierung beim Molekulargewicht von 399,3 g/mol bezeichnet den besten Split des Molekulargewichts anhand der Toxizität der Stoffe, berechnet nach dem Calinski&Harabasz-Kriterium.

Diese Analyse bestätigt die Erwartung, dass Stoffe mit niedrigerem Molekulargewicht tendenziell eine höhere Toxizität haben als Stoffe mit höherem Molekulargewicht, da kleine Moleküle besser vom Körper resorbiert werden als größere.

LogP und Toxizität Die Bandbreite des logP aller Stoffe reicht von -17,41 bis 12,85 (Abbildung 2.21). Die meisten Stoffe verteilen sich im Bereich von etwa 0 bis 5. Nach dem Calinski&Harabasz-Kriterium wurde der *Best Split* für Werte $\leq 5,28$ ermittelt. Demnach liegen 785 Stoffe unterhalb dieser Grenze und 114 Stoffe oberhalb. Ein Split der Toxizität wurde wie bei dem Molekulargewicht bei dem Wert 10 festgelegt. Stoffen mit einem Wert > 10 wird demnach eine hohe Toxizität zugewiesen, Stoffe ≤ 10 gelten als gering toxisch. Im Bereich des höheren logP wurde somit 14 von 114 Stoffen eine hohe Toxizität zugewiesen ($14/114 = 0,123$), bei den Stoffen im Bereich des unteren logP wurde 186 von 785 Chemikalien eine hohe Toxizität zugewiesen ($186/785 = 0,237$).

Im Bereich der unteren logP bis einschließlich 5,28 wurde ein Anteil von 23,7% der Stoffe als hoch toxisch eingeteilt. Bei den Stoffen mit einem logP $> 5,28$ wurden hingegen lediglich 12,3% der Stoffe mit einer hohen Toxizität bewertet. Stoffe mit einem niedrigeren logP sind also etwa doppelt so häufig als hoch toxisch eingestuft worden wie Stoffe mit höheren logP.

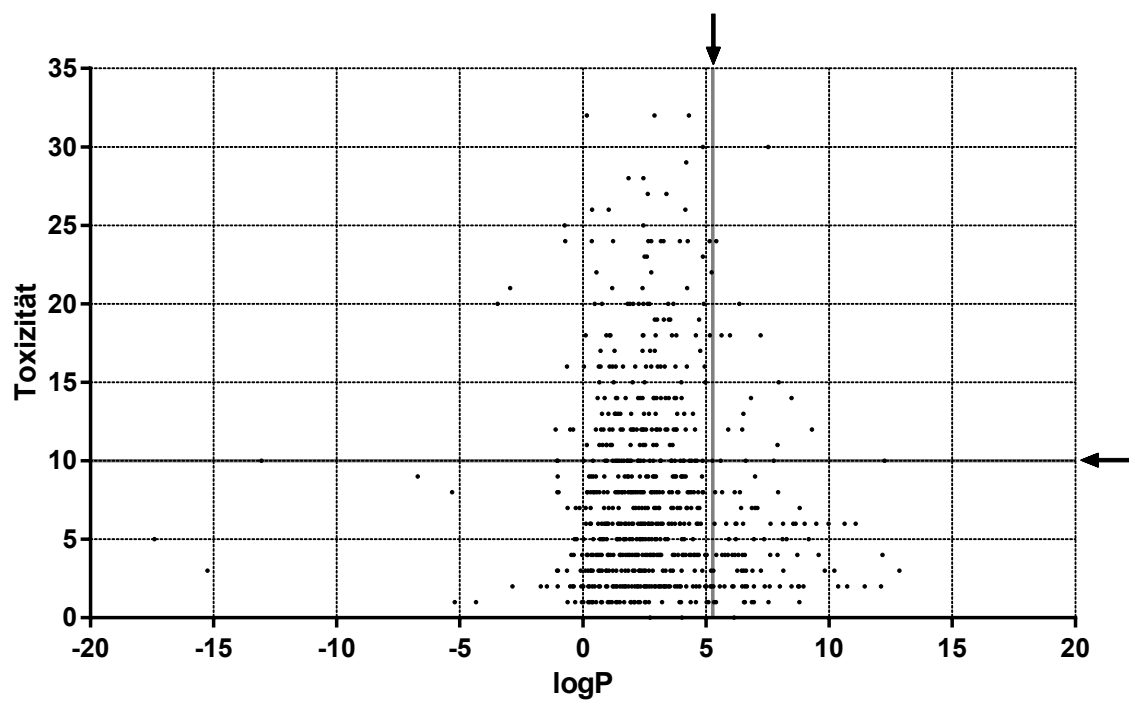


Abbildung 2.21.: Verhältnis des Oktanol-Wasser-Koeffizienten der Stoffe gegenüber der Toxizität. Die graue Markierung bei einem logP von 5,28 bezeichnet den besten Split des logP anhand der Toxizität der Stoffe, berechnet nach dem Calinski&Harabasz-Kriterium.

3. Risikoabschätzung ohne substanzspezifische toxikologische Daten - das TTC-Konzept

3.1. Einleitung

Kontakt zu Chemikalien ist für Menschen unumgänglich. Chemikalien umgeben uns überall, sei es durch Exposition am Arbeitsplatz, durch Gebrauchsgegenstände oder durch Lebensmittel und deren Verpackungen. Im Laufe seines Lebens kommt ein Mensch daher mit tausenden Chemikalien in Berührung. Die Aufnahmewege sind ebenso vielfältig. Die Aufnahme kann oral erfolgen, im Falle von kontaminierten Lebensmitteln oder durch unbeabsichtigtes Verschlucken. Ebenso ist eine Aufnahme über die Lunge möglich, indem Aerosole eingeatmet werden. Eine dermale Exposition ist in erster Linie der Kosmetik-Industrie geschuldet, da sie in ihren Produkten eine Vielzahl an Chemikalien verarbeitet.

Im Bereich von Lebensmitteln ist aber auch die bewusste Exposition alltäglich. Dies können Stoffe wie Geschmacksverstärker oder Konservierungsstoffe zur verlängerten Haltbarkeit sein.

Nach Exposition mit den Substanzen können diese auf verschiedenste Weise toxikologisch relevante Wirkungen verursachen, falls ausreichende Mengen aufgenommen werden.

3.1.1. Geschichte des TTC

Der *threshold of toxicological concern* (TTC) ist ein Tool zur Risikobewertung, das es dem Anwender erlaubt, eine Gruppe von Chemikalien geringer Exposition zu screenen. Der Vorteil des TTC liegt darin, dass Substanzen bewertet werden können, zu denen nur sehr wenige oder gar keine toxikologischen Daten zur Verfügung stehen. Grundidee des TTC ist es, unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors allgemeine Werte zu ermitteln, unterhalb derer das Risiko adverser Effekte auf die menschliche Gesundheit

gering ist, oder kein signifikantes Risiko besteht [32]. Der Grenzwert einer Substanz wird dabei allein aufgrund der chemischen Struktur und bekannten Toxizitätsdaten strukturell ähnlicher Stoffe ermittelt. Das TTC-Konzept ist also ein probabilistischer Ansatz, der auf bereits vorhandenen Kenntnissen über die Toxizität chemischer Substanzen und deren NOAELs beruht. Anwendung finden bereits existierende TTC-Werte bei oraler Exposition, da sie von der empirischen Verteilung der NOAELs von Tierversuchsstudien mit wiederholter oraler Gabe hergeleitet wurden. Erste regulatorische Anwendung fand der TTC in den 1980er Jahren in den USA, als die *US Food and Drug Administration* (FDA) einen Grenzwert (*threshold of regulation*) bei Stoffen in Nahrungsmittelverpackungen festlegte [33]. Seinen Ursprung hat die Methode in der Idee, das Risikopotential von „low level“-Substanzen in Nahrungsmitteln zu bestimmen, da es nicht möglich ist, für sämtliche in der Nahrung auftretenden Untersubstanzen toxikologische Daten zu generieren. Der TTC soll dabei nicht etwaige toxikologische Tests ersetzen, aber als eine Art Schnelltest erlauben zu bestimmen, ob eine Risikobewertung der Inhaltsstoffe notwendig wird oder nicht. Somit hat die Methode das Potential, Substanzen als unbedenklich einzustufen und etwaige Tierversuche einzusparen. Mittlerweile konnte das Konzept auch auf andere Bereiche als Stoffe, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen, ausgeweitet werden. Dabei wurde es auf unterschiedliche Anwendungsbereiche, Endpunkte und Applikationsrouten übertragen [34].

Seine Anfänge fand der TTC 1967. J. P. Frawley präsentierte auf der Jahrestagung der *British Industrial Biological Research Association* (BIBRA) seine Ergebnisse einer Untersuchung von 220 Chemikalien [35]. Diese teilten sich auf in Lebensmittelzusatzstoffe, Chemikalien aus Verpackungsmaterialien, Chemikalien für Industrie und Haushalt und Pestizide. Erhoben wurden die Daten aus chronischen Zwei-Jahres-Tierversuchsstudien mit Nagern, die oral exponiert wurden. Dieser Datensatz entsprach etwa 90 % aller verfügbaren chronischen Toxizitätsstudien zu dieser Zeit. Er unterteilte den Datensatz in 6 Kategorien in Abhängigkeit der zugeordneten NOELs und darüber hinaus in (1) Schwermetalle und Pestizide sowie in (2) alle anderen Stoffe (Tabelle 3.1). Von den 220 ermittelten NOELs der getesteten Chemikalien erreichten lediglich 40 einen Wert unter 100 mg/kg und nur 19 waren mit einem NOEL von unter 10 mg/kg versehen. Abgesehen von Acrylamid, waren alle dieser Substanzen Pestizide oder Schwermetallverbindungen. Die Substanzen mit einem niedrigeren NOEL als 1 mg/kg waren ausschließlich Pestizide. Frawleys Motivation war es, einen Grenzwert von Chemikalien in Verpackungsmaterialien von Nahrungsmitteln festlegen zu können, unterhalb dessen keine Gefahr für den Konsumenten der Nahrungsmittel vorhanden sei. Aufgrund seiner Analysen schlug er einen Grenzwert von 10 mg/kg vor, den er

Tabelle 3.1.: Frawleys Klassifizierung von 220 Chemikalien. Davon jeweils in der entsprechenden Klasse der Anteil an Schwermetallen und Pestiziden (nach [36]).

NOELs (mg/kg)	Anzahl Chemikalien (220)	Schwermetalle und Pestizide (88)
<1	5	5
<10	19	19
<100	40	39
<1000	101	72
<10.000	151	86
≥10.000	220	88

noch mit einem Sicherheitsfaktor von 0,01 versah. So ergab sich ein Grenzwert von 0,1 mg/kg für menschliche Nahrungsmittel [36].

Der nächste bedeutende Schritt in Richtung TTC wurde 1995 durch die Einführung der Strategie der *Threshold of Regulation* von Seiten der FDA gemacht. Der Begriff ‘*Threshold of Regulation*’ wird in den USA eher als *Threshold of Toxicological Concern* verwendet, basiert aber auf dem Prinzip des TTC [36]. Somit wurden die ersten wirklichen TTC-Werte für eine Datenbank von Chemikalien erhoben, die Bestandteile von Verpackungsmaterialien waren und daher unbeabsichtigt in die Nahrungsmittel gelangen konnten. Darüber hinaus enthielt die Datenbank Geschmacksverstärker, also bewusst zugesetzte Stoffe. Die FDA griff dabei auf die *Carcinogenic Potency Database* (CPDB)¹ von Gold et al. [37, 38] zurück. Mit einer statistischen Analyse entwickelte sie daraus den *Threshold of Regulation*, einen Grenzwert in den Nahrungsmitteln von 1,5 µg/d. Die FDA widerspricht allerdings einer Nutzung dieses Grenzwertes für bekannte Karzinogene, obwohl sie auf Grundlage kanzerogener Stoffe getroffen wurden. Da der Wert von 1,5 µg/d allerdings sehr konservativ ausgelegt ist, kann man ihn beinahe für jede Chemikalie unbekannter Toxizität anwenden. So berichteten Barlow et al. [39] nach einer Untersuchung von nicht-kanzerogenen, jedoch potentiell kritischen Endpunkten, dass eben dieser Grenzwert der FDA wegen seines hohen *margin of safety* (Sicherheitsspanne) auch bei Endpunkten wie Immun-, Neuro- und Entwicklungstoxizität, oder für endokrine Disruptoren angewandt werden könnte [33].

Die CPDB wurde später von Cheeseman et al. [40] noch einmal in Augenschein genommen. Hierbei benannten sie acht *structural alerts* für hochpotente Karzinogene, die, ob ihrer Potenz, von den TTC-Ansätzen ausgeschlossen werden sollten. Dieser

¹Die Datenbank kann in der aktuellen Version unter folgender URL bezogen werden: <http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/159e.htm>

Ansatz wurde daraufhin von Kroes et al. [41] ergänzt. Die Autoren schlagen vor, von dem Ansatz außerdem Schwermetalle, Stoffe mit hohem Molekulargewicht und Proteine auszunehmen. Darüber hinaus empfehlen sie diesen Ausschluss auch für endokrin wirksame Substanzen. Da diese aber einen großen Bestandteil der Munro-Datenbank [42] (Abschnitt 3.1.2) ausmachen, einer Referenzdatenbank für TTC, dort aber der Cramer-Klasse III (Abschnitt 3.1.5) zugeordnet sind, beschloss die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority* - EFSA), dass die endokrin wirksamen Substanzen in dieser Klasse hinreichend behandelt würden. Desweiteren empfiehlt die EFSA jedoch, Organophosphate oder Carbamate, also Substanzen, die als Cholinesterase-Hemmer wirken, gesondert zu behandeln. In einem Ansatz von Kroes et al. [41] wurde so für 31 entsprechende Stoffe aus der Munro-Datenbank ein TTC-Wert von 18 µg/Tag ermittelt [33].

3.1.2. Weitere Arbeiten und Datenbanken mit TTC

Die Munro-Datenbank [42] gilt als Referenz, wenn es um die Entwicklung von TTC-Werten geht. Dies liegt zum einen an der freien Verfügbarkeit, zum anderen an dem relativ großen Datensatz mit 613 Chemikalien. Die Verfasser der Datenbank stellten schon selbst die TTC-Werte zusammen und teilten die Stoffe in die drei Klassen der Cramer-Klassifikation ein. Kroes et al. [41, 43] untersuchten den TTC-Ansatz in Hinblick auf allgemeine Endpunkte in der Toxizität und für spezielle Endpunkte, wie Karzinogenität oder Teratogenität, und entwarfen einen eigenen Entscheidungsbaum-Ansatz. Andere Datenbanken, die in die Entwicklung von TTC-Ansätzen mit eingeflossen sind, sind im Wesentlichen die ELINCS-Datenbank [44, 45] und eine Datenbank mit *food contact materials* [46]. Escher et al. [47] verwendeten die RepDose-Datenbank, die ToxRef-Datenbank der US-Amerikanischen Umweltschutzbehörde *US Environmental Protection Agency* (EPA) und die Toxbase-Datenbank, um die Cramer-Klassifikation weiterzuentwickeln und die Spezifität der Klassenzugehörigkeit zu verbessern und damit geeignetere TTC-Werte zu erzeugen.

Im Jahr 2012 veröffentlichte die EFSA eine *Scientific Opinion*, bei der das TTC-Konzept und die zugrundeliegenden Annahmen detailliert beschrieben sind [48]. Bestandteil der *opinion* ist unter anderem der Ausschluss einiger Kategorien, sowie die Herangehensweise der *route-to-route extrapolation* (Übertragung von Grenzwerten eines Verabreichungsweges auf einen anderen, bspw. oral - dermal), da die meisten verwendeten Datenbanken NOAELs aus Tierversuchsstudien wiederholter Gabe mit oraler Verabreichung enthalten, wohingegen Studien anderer Verabreichungswege nur begrenzt in Datenbanken zu finden sind. So ist etwa die allgemeine Meinung, dass die Anzahl

an Studien mit wiederholter Gabe, in denen eine dermale Verabreichung erfolgte, nicht ausreichend ist, um dermale TTC-Werte zu ermitteln [49, 50].

Eine entscheidende Empfehlung der Europäischen Union [51] für die Munro-Datenbank liegt darin, die NOAELs der Datenbank von der 'externen' in die 'interne' Dosis zu konvertieren, also die Bioverfügbarkeiten für jede Substanz zu ermitteln und daraus interne TTC-Werte zu berechnen, die die Realität besser abdecken würden als die üblichen externen TTC-Werte.

3.1.3. TTC in der Regulatorik

In der regulatorischen Anwendung kam in den letzten Jahren verstärktes Interesse am TTC-Konzept auf, da es auch hier als Alternativ-, respektive Ergänzungsmethode im Rahmen der REACH-Verordnung dienen kann. So nutzt etwa die EFSA das Konzept zur Bewertung von Geschmacks- und Aromastoffen in Nahrungsmitteln und für Pestizidmetabolite im Grundwasser. Die Europäische Arzneimittel-Agentur (*European Medicines Agency* - EMA) empfiehlt hingegen die Anwendung von TTC, um genotoxische Verunreinigungen in Pharmazeutika zu bewerten. Auch außerhalb der EU findet TTC in regulatorischen Fragestellungen Verwendung. Die FDA greift vermehrt auf TTC zurück, beispielsweise, wie die EFSA, zur Bewertung von Nahrungsmittelzusätzen oder für Verpackungstoffe. Darüber hinaus zieht die FDA in Erwägung, genotoxische und karzinogene Verunreinigungen in Arzneimitteln mittels TTC zu bewerten [33].

Da der TTC ein probabilistischer Ansatz ist, sollte der hervorgebrachte TTC-Wert nicht als „sichere Dosis“ sondern als „wahrscheinlich sichere Dosis“ bezeichnet werden. Der Gemeinsame FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* - JECFA) [52] definiert einen TTC-Wert demnach wie folgt:

„A threshold of toxicological concern is the level of human exposure below which no significant risks to health are anticipated, even in the absence of toxicological data.“

3.1.4. Ermittlung der TTC-Werte

1. Es wird ein Histogramm erstellt, in dem die Häufigkeitsverteilung der studienweiten NOAELs, also unter Einbeziehung aller Endpunkte, aufgetragen ist.
2. Aus der Verteilungsfunktion des Histogramms wird eine kontinuierliche Verteilungsfunktion bestimmt. In der Regel wählt man hier die log-Normalverteilung.

3. Die Verteilungskurve aus 2. bildet die Grundlage für eine kumulative Verteilungsfunktion. Aus dieser Kurve lässt sich eine Dosis ableiten, die von einem definierten Anteil aller Verbindungen unterschritten wird. Standardmäßig wird dieser Anteil mit 5 % festgelegt, also das untere fünfte Percentil, kann bei Bedarf aber auch verändert werden.
4. Der so erhaltene Schwellenwert wird mit einem Sicherheitsfaktor von 0,01 multipliziert, um den Wert vom Tier auf den Menschen zu skalieren.

Die Verrechnung mit diesem Faktor entspricht der gängigen Vorgehensweise bei der Herleitung von *acceptable* oder *tolerable daily intakes* (ADI², TDI³).

3.1.5. Cramer-Klassen

Eine weit verbreitete Methode zur Klassifikation beliebiger Substanzen nach strukturellen Eigenschaften ist die Cramer-Klassifikation, die für nicht-kanzerogene Stoffe angewandt wird. Diese Klassifikation unterscheidet sich von anderen strukturbasierten Separatoren dahingehend, dass einzelne Chemikalien nicht einer bestimmten Strukturfamilie zugeordnet, sondern in Klassen verschiedener Toxizität aufgeteilt werden. Zwar werden auch bei dieser Vorgehensweise die Strukturelemente der Chemikalien genutzt, aber nur um die Toxizität abzuleiten. Mittels binärem Entscheidungsbaum werden die Stoffe anhand struktureller Merkmale in drei verschiedene Klassen eingeteilt. Der Baum enthält insgesamt 33 verschiedene Fragestellungen, auf die die Substanzen hin überprüft werden. Grob differenziert der Entscheidungsbaum über chemische Strukturfragmente wie aliphatische, azyklische, aromatische und heterozyklische Strukturen, wie auch Terpenoide. Substanzen in Cramer-Klasse 1 gelten als „nicht-toxisch“. Dies sind im wesentlichen simple chemische Verbindungen mit bekanntem Metabolismus und harmlosen Stoffwechselprodukten, die eine geringe orale Toxizität vermuten lassen. „Möglicherweise toxische“ Substanzen werden in Cramer-Klasse 2 eingeordnet. Das sind Stoffe, die nicht eindeutig in Klasse 1 oder Klasse 3 eingruppiert werden können. Dieser Umstand ist gegeben, wenn sie aufgrund ihrer Komplexität nicht zu Klasse 1 zugeordnet werden können, andererseits aber keine Strukturelemente aufweisen, die eine Toxizität wahrscheinlich machen und die Einordnung in Klasse 3 rechtfertigen würden. Stoffe aus Klasse 2 können funktionelle Gruppen wie Furfurylalkohol oder Propionsäureethylester enthalten. Die dritte Klasse bildet Substanzen, die

²Acceptable Daily Intake - Tolerierte Tagesdosis einer Substanz bei lebenslanger täglicher Einnahme

³Tolerable Daily Intake - Tolerierte Tagesdosis einer ungewollten Verunreinigung bei lebenslanger täglicher Einnahme

als „wahrscheinlich toxisch“ oder „eindeutig toxisch“ gelten. Eindeutig toxische Substanzen weisen folgende Strukturmerkmale auf:

- Aliphatische sekundäre Amine oder deren Salze. Cyano-, N-Nitroso-, Triazeno-, Diazo- oder quaternäre Stickstoffverbindungen, außer in den Formen $>C=N^+R_2$, $>C=N^+H_2$, sowie die Hydrochlorid- und Sulfatsalze von primären und tertiären Aminen
- nicht-geladene Substituenten (mit Ausnahme von C, H, O, N und bivalentem Schwefel)
- Verbindungen mit Safrol-Elementen
- an andere Ringe kondensierte Laktone oder α,β - ungesättigte fünf- oder sechsgliedrige Laktone
- heterozyklische Dreifachringe (z.B. Epoxide)
- zyklische Verbindungen ohne Substituenten
- mindestens 3 funktionelle Gruppen (ausgenommen Methoxygruppen; Säuren und Ester gelten als eine funktionelle Gruppe)
- unsubstituierte aromatische Kohlenwasserstoffe
- Verbindungen, die an Hauptstrukturkomponenten pro 20 oder weniger C-Atome kein Na-, K- oder Ca-Sulfonat oder -Sulfamat tragen

Darüber hinaus enthält die dritte Klasse auch solche Stoffe, die vom Algorithmus nicht erfasst werden können und demnach in keine andere Substanzklasse eingeordnet werden. Entsprechend ist für Substanzen dieser Klasse nicht ersichtlich, ob sie aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften der Klasse zugewiesen wurden oder einfach aufgrund mangelnder Datenlage [53, 54].

Eine Untersuchung des ELINCS-Datensatzes nach dem üblichen TTC wurde bereits vorgenommen [45]. Auch hier wurden Schwächen der Klassifizierung nach Cramer deutlich, nachdem eine Unterscheidung zwischen toxischen und nicht-toxischen Substanzen nur bedingt erfolgreich vorgenommen wurde.

3.1.6. Internes TTC-Konzept

Neu ist die Herangehensweise der Bestimmung des internen TTC. Das bedeutet, dass nicht die reinen NOELs zur Berechnung des TTC verwendet werden, sondern dass

die intern verfügbare Dosis als Ausgang ermittelt wird. Dies erfordert zunächst eine Ermittlung der Bioverfügbarkeiten sämtlicher Stoffe, auf die der TTC angewendet werden soll. Die Fraktionen der berechneten Bioverfügbarkeiten werden mit den NOAELs multipliziert, sodass im Anschluss interne NOAELs zur Verfügung stehen. Von den so ermittelten internen NOELs wird das fünfte Perzentil berechnet. Das ist der Wert, bei dem 5% aller Chemikalien niedrigere NOAELs und 95% höhere NOAEL-Werte aufweisen (Abschnitt 3.2.5). Dieser ermittelte Wert ist der TTC-Wert, also der Grenzwert, unterhalb dessen das Risiko adverser Effekte einer Substanz gering ist. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass die Expositionswege herausgerechnet werden können. Somit können TTC-Werte von Substanzen, die mit Tierversuchsstudien oraler Gabe ermittelt wurden, auch auf Substanzen angewendet werden, für die nur sehr wenige NOELs zur Verfügung stehen, etwa bei Studien dermalen Applikation.

3.2. Methoden

3.2.1. Eingesetzte Software

3.2.1.1. Toxtree

Die Software Toxtree wurde von der Firma Ideacon Ltd aus Bulgarien im Auftrag des *JRC Computational Toxicology and Modelling* der Europäischen Kommission entwickelt⁴. Sie ist frei erhältlich, plattformunabhängig und ermöglicht unter anderem eine sehr einfache Zuordnung beliebiger Substanzen zur Cramer-Klassifikation. Hierzu berechnet das Programm auf Basis von Eingabedaten, die im SMILES⁵- oder MOL-Format eingegeben werden können, anhand eines Entscheidungsbaums die entsprechende Cramer-Klasse. Der Entscheidungsbaum besteht aus insgesamt 33 Ja/Nein-Fragen, die teilweise durchlaufen werden, bis eine Zuordnung erfolgt. Die Entwickler hielten sich bei der Implementierung im Wesentlichen an die Originalarbeit. Abwandlungen finden sich in der Form, dass einige Fragen variiert wurden, um eine bessere Vorhersage zu ermöglichen. Dies wurde am Beispiel der Munro-Datenbank ermittelt [57]. Diese Implementierung der Cramer-Klassifizierung kann auf organische und organometallische Verbindungen angewandt werden, nicht jedoch auf Polymere, Oligomere und anorganische Substanzen. Obwohl die Software mehrere regelbasierte Ansätze für TTC-Bewertungen zur Verfügung stellt, wurde die Klassifizierung nach Cramer ver-

⁴Das Programm kann in der aktuellen Version unter folgender URL bezogen werden: <http://toxtree.sourceforge.net/>

⁵*Simplified Molecular Input Line Entry Specification* - Eine einfache textbasierte, eindeutige Notation von Strukturdaten [55][56]

wendet, da diese am weitesten verbreitet ist. Aktuell (Oktober 2014) liegt die Software in der Version 2.6.6 vor.

3.2.1.2. ACD Percepta

Zur Bestimmung der internen Dosis und damit des internen TTC müssen zunächst die Bioverfügbarkeiten sämtlicher Stoffe ermittelt werden. Optimal wären in dieser Hinsicht natürlich experimentell ermittelte Werte. Da diese aber in der Regel nicht vorliegen, müssen die Werte auf eine andere Art und Weise bestimmt werden. Praktikabel ist hier die Berechnung der Werte mittels Software. Hier wurde das kommerzielle Tool *ACD/Percepta* von *Advanced Chemistry Development, Inc.* (ACD/Labs®) verwendet, das es ermöglicht, eine Batchkalkulation mehrerer Stoffe durchzuführen. Die Software berechnet anhand der Strukturformeln die orale Bioverfügbarkeit der Stoffe in Prozent, hierfür nutzt es eine Kombination aus probabilistischen und mechanistischen Modellen [58]. Das Tool erlaubt sowohl die Vorhersage physikochemischer Eigenschaften, als auch der Parameter Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion (ADME). Es basiert auf mechanistischen QSAR-Analysen humaner intestinaler Absorption unter Einbeziehung der physikochemischen Eigenschaften von Substanzen. Für die Berechnung wird eine passive Absorption simuliert. Die Bioverfügbarkeit (*HIA - human intestinal absorption*) wird durch Gleichung 3.1 ermittelt. In dem Modell wird angenommen, dass der Stoff sieben verschiedene Kompartimente durchläuft, mit jeweils der gleichen Verweildauer und einer linearen Übergangskinetik untereinander. Das Kolon wird lediglich als Reservoir des Stoffs betrachtet. C_A beschreibt im Modell einen Skalierungsfaktor und P_{eff} die effektive Permeabilität, die abhängig ist von der Diffusion durch eine Wasserschicht (P_{UWL}), transzellulärem Transport (P_{trans}) und parazellulärem Transport (P_{para}) der Substanz (Gleichung 3.2). Laut Autoren entsprechen Werte, die durch dieses Modell berechnet werden, am ehesten experimentell ermittelten Werten.

$$\%HIA = 100\% \times (1 - (1 + C_A P_{\text{eff}})^{-7}) \quad (3.1)$$

$$P_{\text{eff}} = \left(\frac{1}{P_{\text{UWL}}} + \frac{1}{P_{\text{trans}} + P_{\text{para}}} \right) \quad (3.2)$$

Dieser Ansatz wird seit vielen Jahren zur Vorhersage der Bioverfügbarkeit genutzt und ist insbesondere in der Arzneimittelforschung weit verbreitet [59].

3.2.1.3. OpenBabel

Physikochemische Eigenschaften für die Substanzen aller Datenbanken wurden, sofern verfügbar, aus Dokumenten und veröffentlichten Quellen entnommen. Dies beschränkte sich im Wesentlichen auf Teile der ELINCS-Daten. Für andere Substanzen mussten die physikochemischen Eigenschaften wie der negative dekadische Logarithmus der Säurekonstanten pK_a , der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P$ und das Molekulargewicht berechnet werden. Hierfür wurde die frei verfügbare Software OpenBabel⁶ verwendet [60]. Die Substanzen in den Datenbanken wurden mit den so gewonnenen Daten verglichen, um mögliche Unterschiede in Bezug auf die physikochemischen Daten zu finden. OpenBabel wurde des Weiteren verwendet, um Umrechnungen zwischen verschiedenen Dateiformaten für Strukturen zu verwenden.

3.2.2. Datenbanken

Um einen umfangreichen Datenpool zu erhalten, wurden bei dieser Methode mehrere Datenbanken verwendet. Diese waren im einzelnen eine Auswahl aus der *European List of Notified Chemical Substances* (ELINCS)[45, 25], die Munro-Datenbank [42, 54] und eine Datenbank zu *food contact materials* [46]. Die Datenbanken enthalten keine Überschneidungen ihrer Substanzen, sodass jede Substanz nur in einer der aufgeführten Datenbanken zu finden ist. Die Strukturen wurden aus Dokumenten (ELINCS- und EFSA-Dokumenten) oder im Falle der Munro-Datenbank aus publizierten Quellen entnommen.

Die NOAELs wurden insoweit angepasst, als dass approximierte Werte für chronische Studien ermittelt wurden. Hierfür wurden für die 28-Tage-Studien ein Skalierungsfaktor von 5, und für die 90-Tage-Studien ein entsprechender Faktor von 2 verwendet. Diese Vorgehensweise entspricht den Empfehlungen des Europäischen Zentrums für Ökotoxikologie und Toxikologie von Chemikalien (*European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals* - ECETOC), der Europäischen Chemikalienagentur (*European Chemicals Agency* - ECHA) und von Kaberlah und Schneider [61, 62].

3.2.2.1. ELINCS

Die ELINCS-Datenbank enthält NOAELs aus 28-Tage und 90-Tage-Studien. Der Datensatz umfasst 765 neue Chemikalien aus der *European List of Notified Chemicals*, die in Europa zwischen 1982 und 2008 registriert wurden. Die Analyse gründete auf den Ergebnissen von 28-Tage subakuten Tests, die nach OECD TG 407 bei 710 Che-

⁶Das Programm kann in der aktuellen Version unter folgender URL bezogen werden: http://openbabel.org/wiki/Main_Page

mikalien durchgeführt wurden [45]. Für weitere 55 Chemikalien wurden nach OECD TG 408 subchronische 90-Tage-Studien durchgeführt. Zusätzliche Informationen zur ELINCS-Datenbank werden in Abschnitt 2.1.10 und Abschnitt 2.2.1 gegeben.

3.2.2.2. Munro

Die Munro-Datenbank⁷ enthält 613 Substanzen, die alle in die Berechnungen eingingen. Die Datenbank wurde unter der Leitung der FDA erstellt und steht als Referenzdatenbank für wissenschaftliche Untersuchungen frei zur Verfügung. Die enthaltenen Stoffe decken ein weites Spektrum an Chemikalien ab und reichen von Industriechemikalien und Arzneimitteln, über Nahrungsmittelinhaltsstoffe bis hin zu Umwelt-⁸, Landwirtschafts- und Verbraucherchemikalien.

Die Daten stammen aus verschiedenen Quellen. Darunter das JECFA, das *U.S. Environmental Protection Agency's Integrated Risk Information System (IRIS)*, *National Toxicology Program (NTP)*, der *Developmental and Reproductive Toxicity (DART)*-Datenbank und weiteren Veröffentlichungen. Die Datenbank enthält keine Organometallverbindungen, anorganischen Substanzen, Gemische oder Substanzen ohne Strukturdaten. Die Datenbank beschränkt sich auf Studien mit oraler Verabreichung an Nagern und Kaninchen und mit subchronischer und chronischer Studiendauer, sowie Reproduktions- und Teratogenitätsstudien. Entscheidendes Kriterium war darüber hinaus, dass sowohl ein NOEL, als auch ein LOEL ermittelt wurden [42].

3.2.2.3. FCM

Eine Datenbank mit Daten von *food contact materials (FCM)*, also Inhaltsstoffen von Lebensmittelverpackungen, enthielt ursprünglich 249 Substanzen. Nicht zu allen Stoffen waren hinreichende Daten vorhanden, die sie für eine TTC-Analyse qualifizierten. Teilweise fehlten TDI- oder ADI-Werte, aus denen der entsprechende NOAEL ermittelt hätte werden können, teilweise fehlten die Strukturdaten wie SMILES-Codes und IUPAC-Namen⁹ oder auch Hinweise auf diese wie CAS-Nummern, sodass letztendlich ein Datensatz aus 199 Substanzen dieser Stoffgruppe zur Verfügung stand. Die Daten stammen aus dem *'synoptic document' (EC 2005) for compounds evaluated for their safety by the Scientific Committee on Food (SCF)* [63], die vor dem Jahr 2002 veröffentlicht wurden. Aus den veröffentlichten TDI- und ADI-Werten wurden durch

⁷Die Datenbank kann in der aktuellen Version unter folgender URL bezogen werden: <http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/159e.htm>

⁸Ein chemischer Stoff, der durch Industrie oder Landwirtschaft in die Umwelt gelangt und geeignet ist, Lebewesen und Umwelt zu gefährden.

⁹*International Union of Pure and Applied Chemistry* - Nomenklatur zur eindeutigen Beschreibung von chemischen Strukturen

Multiplikation mit einem Sicherheitsfaktor von 100 die entsprechenden NOAELs generiert [46].

3.2.3. Berechnung des internen NOAELs

Zur Berechnung der internen NOAELs wurden die externen NOAELs mit den Fraktionen der berechneten Absorption und Bioverfügbarkeit multipliziert. In den Fällen, in denen *ACD Percepta* eine Bioverfügbarkeit von 0 ermittelt hatte, wurde die Bioverfügbarkeit manuell auf 0,001, also 0,1 % gesetzt, um 0-Werte des internen TTC zu vermeiden. Im Anschluss wurde die empirische Verteilung aller Datenbanken zusammen und für jeden Datensatz einzeln erstellt.

3.2.4. Cramer-Klassifikation

Die Daten in dieser Arbeit wurden durch das Klassifizierungssystem nach Cramer unterteilt. Für jede der drei Klassen wurden separat die internen TTC-Werte ermittelt. Trotz der teilweise ernüchternden Qualität der Klassifizierung wurde mangels Alternative auch hier die Cramer-Klassifikation genutzt. Für die Klassifizierung wurde die Software Toxtree (Abschnitt 3.2.1.1) genutzt.

In der Analyse der ELINCS-Datenbank von Kalkhof et al. [45], konnte schon das limitierte Potential der Klassifizierung, toxische von untoxischen Substanzen zu unterscheiden, gezeigt werden. In vielen Abhandlungen wurden die Schwächen aufgezeigt (z.B. [51]) und diskutiert, dass TTC-Werte für die zweite Klasse sehr große Unsicherheiten aufwiesen, da sie sich auf sehr geringe Zahlen an Substanzen stützen, die in dieser Klasse aufgenommen wurden. Auch in den Datenbanken dieser Arbeit konnten nur 3,7 % aller Substanzen nach Durchlaufen des Entscheidungsbaums Klasse II zugeordnet werden (Abb. 3.1). Daher wurden die Substanzen aus Klasse II (möglicherweise toxisch) mit den Substanzen aus Klasse III (eindeutig toxisch) als eine gemeinsame Klasse II/III zusammengelegt und als solche auch mit TTC-Werten (interne und externe) versehen.

3.2.5. Bestimmung des TTC

Wie Abbildung 3.2 zeigt, weisen die NOAEL-Werte der Chemikalien in den drei Datenbanken sehr verschiedene Verteilungen auf. Während die NOAELs der Munro-Datenbank einer Log-Normal-Verteilungsfunktion folgt, weichen die Werte der ELINCS-Datenbank, und insbesondere die der FCM-Datenbank davon ab. Daher musste von der üblichen Vorgehensweise abgewichen werden. So wurde statt der üblichen Log-Normal-Verteilungsfunktion eine empirische Verteilung der ursprünglichen Daten erstellt. Dazu

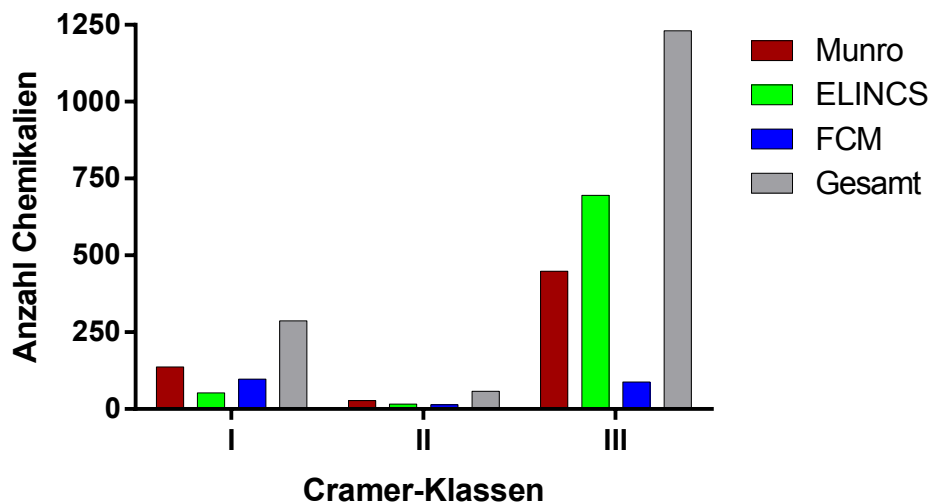
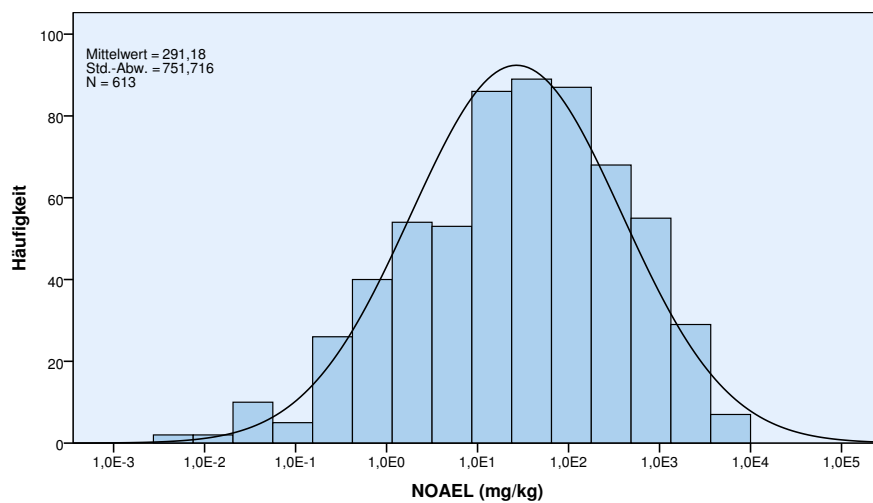


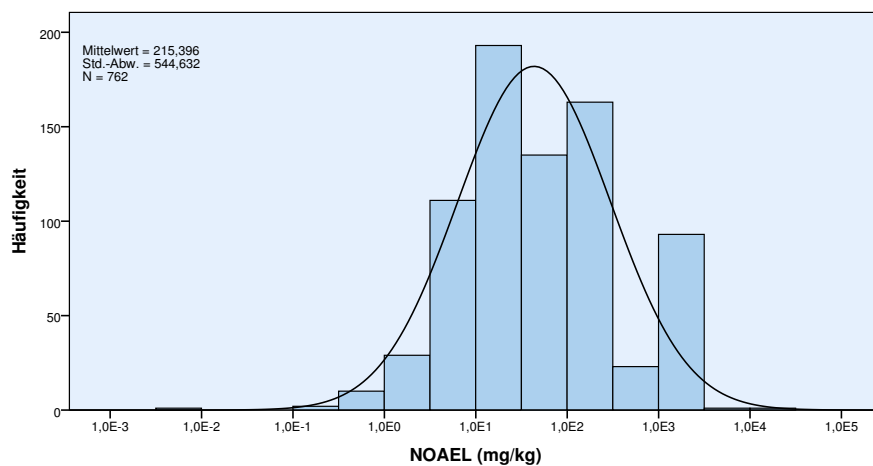
Abbildung 3.1.: Aufteilung der in den Datenbanken enthaltenen Substanzen in die drei Cramer-Klassen. Auffällig ist die gute Abdeckung der dritten Klasse bei allen Datenbanken, wohingegen die erste Klasse nur mäßig abgedeckt ist. Schwachpunkt ist die zweite Klasse, der bei allen drei Datenbanken nur sehr wenige Chemikalien zugeordnet wurden.

wurden für die externen Werte die NOAELs/100 berechnet und für die internen Werte die NOAELs/25. Entsprechend der üblichen Vorgehensweise wurde das untere fünfte Perzentil der Verteilungen als TTC-Wert bestimmt. Das bedeutet, dass für jede der drei Verteilungen der internen NOAELs ein Wert festgelegt wurde, von dem 5% aller Chemikalien niedrigere NOAELs und 95% höhere NOAEL-Werte aufwiesen. Darüber hinaus wurde auch das untere zehnte Perzentil zur Information ermittelt.

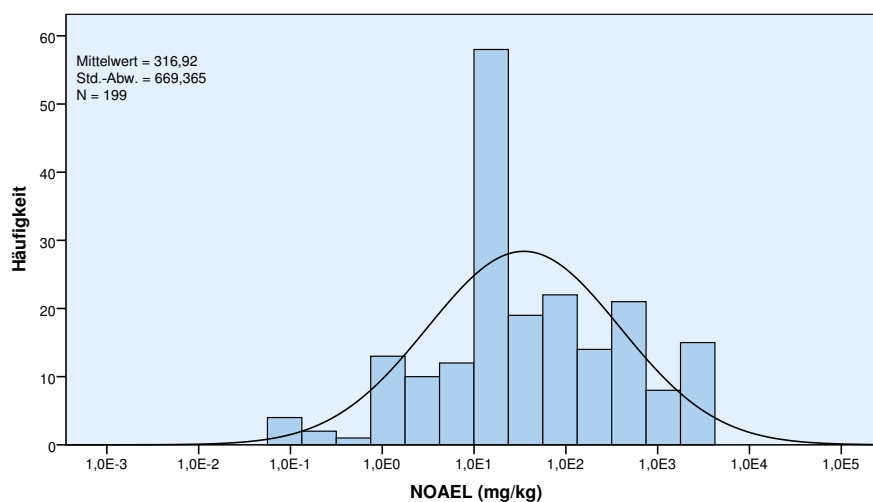
Das untere fünfte respektive zehnte Perzentil wird dann mit einem Sicherheitsfaktor versehen. In der Regel wird hierbei der Sicherheitsfaktor von 0,01 verwendet. Dieser Faktor entspricht demselben, der auch bei der Herleitung des ADI oder TDI Anwendung findet. Er ist aufgeteilt in zwei Subfaktoren von jeweils 10 - Ein Interspezies- und ein interindividueller Faktor. Der Interspezies-Faktor gilt für die Umrechnung von Tier zu Mensch, der interindividuelle berücksichtigt die Tatsache, dass auch Menschen untereinander teilweise einen stark variierenden Metabolismus und andere Variablen aufweisen. Der Faktor 10 für die Umrechnung von Tier auf Mensch kann nochmals in die Subfaktoren 4 und 2,5 unterteilt werden, um die Unterschiede in der Toxikokinetik und Toxikodynamik zu berücksichtigen (Abb. 3.6). Dieses Konzept wurde erstmals 1993 von Renwick [50] entwickelt. Bei der Berechnung des internen TTC wird die Verteilung der externen NOAELs aus dem Tierversuch mit der ermittelten Bioverfügbarkeit der entsprechenden Substanz verrechnet. Da der verwendete *In-silico*-Ansatz die humane



(a) Verteilung Munro



(b) Verteilung ELINCS



(c) Verteilung FCM

Abbildung 3.2.: Die Verteilungsfunktionen der NOEL-Werte der Datenbanken. Während die Munro-Datenbank (a) einer Log-Normalverteilung folgt, weichen die ELINCS-Datenbank (b), und insbesondere die Chemikalien der FCM (c) davon ab.

Bioverfügbarkeit der Stoffe berechnet, kann der standardmäßige Sicherheitsfaktor von 1/100 auf 1/25 verringert werden, da der interspezifische Sicherheitsfaktor hier schon berücksichtigt ist [64].

3.2.6. Unsicherheitsanalyse

Eine Unsicherheitsanalyse wurde auf das Ergebnis der Herleitung des internen TTC angewendet. Zwei Fehlerquellen wurden berücksichtigt. Zum einen die Extrapolation der NOAELs der ELINCS-Datenbank von der subakuten auf die chronische Exposition und von der subchronischen auf chronische. Die zweite Unsicherheit betraf die Vorhersage der Bioverfügbarkeit durch die eingesetzte Software.

Für die Unsicherheitsanalyse der Zeitextrapolation wurde auf die Arbeit von Schneider et al. [62] zurückgegriffen. In dieser wurden mehrere Datensätze mit log-normaler Verteilung analysiert. Für die Extrapolation von subchronischer auf chronische Exposition geben die Autoren ein geometrisches Mittel von 2 und eine geometrische Standardabweichung von 2,1 an. Bei der Extrapolation von subakut auf chronisch ermittelten sie ein geometrisches Mittel von 5 und eine geometrische Standardabweichung von 3,5.

Bei der Berücksichtigung der Unsicherheit der Bioverfügbarkeit wurde die Arbeit von Reynolds et al. [58] herangezogen. Die Autoren berechneten den durchschnittlichen Fehler des $\log P_{\text{eff}}$ (*in vivo human jejunal permeability coefficient*), also die effektive Permeabilität durch die intestinale Membran, mit 0,4 log-Einheiten. Dadurch wird die Abhängigkeit der Bioverfügbarkeit (*HIA - human intestinal absorption*) mit dem P_{eff} durch einen empirischen Zusammenhang wie folgt dargestellt:

$$\%HIA = 100\% \times (1 - (1 + C_A P_{\text{eff}})^{-7})$$

wobei C_A einen Skalierungsfaktor darstellt.

Mit gegebenen Parametern wurden die berechneten Werte der angepassten NOAELs der ELINCS-Datenbank modifiziert. Die Bioverfügbarkeiten aller drei verwendeten Datenbanken wurden ebenfalls modifiziert, um anschließend mittels Monte-Carlo-Simulation mit 10.000 Durchgängen zu testen. Die 90 %-Konfidenzintervalle sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Die Simulation wurde mit der Software R¹⁰ durchgeführt.

¹⁰<http://www.r-project.org/>

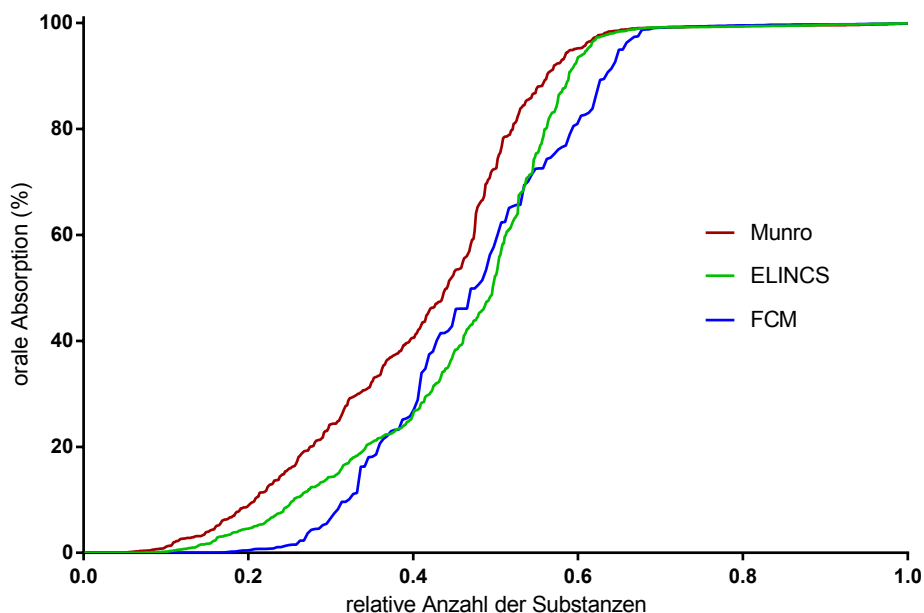


Abbildung 3.3.: Berechnete Bioverfügbarkeiten der Chemikalien der Munro-Datenbank ($n = 613$), ELINCS ($n = 764$) und FCM ($n = 201$). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Anzahl der Substanzen in relativen Häufigkeiten angegeben.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Errechnete Bioverfügbarkeiten

Die berechneten Werte der Bioverfügbarkeiten der einzelnen Substanzen reichen von unter 1% bis zu über 99,5%. Wie in Abb. 3.3 ersichtlich, sind bei den Verteilungen der Bioverfügbarkeiten unter den drei Datenbanken keine größeren Unterschiede auszumachen. Während etwa 10% der Munro- und ELINCS-Datenbank eine orale Bioverfügbarkeit von etwa 0% aufweisen, ist dieser Anteil bei der *Food Contact Materials* mit knapp 20% in etwa doppelt so groß. Gleiches gilt für das Erreichen der maximalen Bioverfügbarkeit. Bei Munro und ELINCS weisen etwa 40% der Substanzen eine Bioverfügbarkeit von ca. 100% auf, während FCM diese Grenze nur mit etwa 30% der Substanzen erreicht. Die Steigungsrate ist bei der Munro-Datenbank dabei etwas höher als bei der ELINCS-Datenbank.

3.3.2. TTC-Werte der Datenbanken

TTC-Werte wurden für Klasse I (nicht toxisch) und eine kombinierte Klasse II/III (wahrscheinlich / sicher toxisch) der Cramer-Klassifikation erstellt. Diese Vorgehens-

weise trägt der Tatsache Rechnung, dass aufgrund von Schwächen der Cramer-Klassifizierung die Anzahl der Substanzen in Klasse II nur sehr gering ausfällt und dadurch hohe Unsicherheiten bei den ermittelten TTC-Werten auftreten würden. Im Folgenden werden für die Datenbanken TTC-Werte für das fünfte Perzentil der NOAELs (Tabelle 3.2) und zusätzlich das zehnte Perzentil (Tabelle 3.3) zum Vergleich angezeigt. In Tabelle 3.4 werden zudem die internen und externen TTC-Werte nicht für jede Datenbank einzeln, sondern für einen Gesamtdatensatz aufgezeigt.

Die Werte für die Munro-Datenbank unterscheiden sich in der vorliegenden Arbeit von den Werten der Originalpublikation von Munro et al. [42]. Das liegt an einer anderen Verteilungsfunktion, die die Autoren nutzten. Sie stützten sich nicht auf eine empirische Verteilung, wie in dieser Arbeit, sondern vermutlich auf eine Log-Normalverteilung.

3.3.2.1. Munro-Datenbank

Basiert der TTC auf dem fünften Perzentil der Verteilung, beträgt der externe TTC-Wert für Cramer-Klasse I 53,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d, für Klasse II und II beträgt der Wert 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d. Die internen TTC-Werte für Klasse I betragen 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d und 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d für die kombinierte Klasse II/III (Tabelle 3.2). Für das zehnte Perzentil betragen die Werte für den externen TTC bei Klasse I 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d und 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d für Klasse II/III. Die internen Werte betragen 27,9 und 0,96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d für Klasse I und Klasse II/III (Tabelle 3.3, Abbildung 3.4).

3.3.2.2. ELINCS-Datenbank

Im Falle des fünften Perzentils der Verteilung beträgt der externe TTC-Wert der Cramer-Klasse I 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d und für Klasse II/III 23,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d. Für den internen TTC belaufen sich die Werte auf 19,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d für Klasse I und 0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d für Klasse II/III (Tabelle 3.2). Für das zehnte Perzentil betragen die externen TTC-Werte der ELINCS-Datenbank 66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d für Klasse I gegenüber 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d für die kombinierte Klasse II/III. Die internen Werte betragen 33,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d bzw. 0,96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d (Tabelle 3.3, Abbildung 3.4).

3.3.2.3. FCM-Datenbank

Für die Datenbank der *food contact materials* konnte für das fünfte Perzentil der Verteilung ein externer TTC-Wert für Klasse I von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d und für Klasse II/III von 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d ermittelt werden. Analog betragen die internen Werte 5,2 bzw. 0,0012 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d (Tabelle 3.2). Bei dem zehnten Perzentil belaufen sich die exter-

Tabelle 3.2.: Externe TTC-Werte ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$), abgeleitet vom fünften Perzentil der empirischen Verteilung der NOAELs, geteilt durch den konventionellen Sicherheitsfaktor 100, und interne TTC-Werte ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$) des empirischen fünften Perzentils der Verteilung der NOAELs, verrechnet mit der Bioverfügbarkeit, geteilt durch einen Sicherheitsfaktor von 25.

	Munro ($n = 613$)	ELINCS ($n = 765$)	FCM ($n = 199$)
Klasse I (n)	137	53	97
externer TTC	53,4	60,0	10,0
interner TTC	1,0	19,6	5,2
Klasse II/III (n)	476	712	102
externer TTC	2,0	23,1	3,0
interner TTC	0,15	0,06	0,0012

Tabelle 3.3.: Externe TTC-Werte ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$), abgeleitet vom zehnten Perzentil der empirischen Verteilung der NOAELs, geteilt durch den konventionellen Sicherheitsfaktor 100, und interne TTC-Werte ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$) des empirischen zehnten Perzentils der Verteilung der NOAELs, verrechnet mit der Bioverfügbarkeit, geteilt durch einen Sicherheitsfaktor von 25.

	Munro ($n = 613$)	ELINCS ($n = 765$)	FCM ($n = 199$)
Klasse I (n)	137	53	97
externer TTC	100,0	66,0	50,0
interner TTC	27,9	33,1	26,0
Klasse II/III (n)	476	712	102
externer TTC	5,0	50,0	10,0
interner TTC	0,96	0,96	0,004

Tabelle 3.4.: Interne TTC-Werte ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$) der drei zusammengefassten Datenbanken (Munro, ELINCS, FCM). Die externen NOAELs wurden mit der Bioverfügbarkeit angepasst und die fünften und zehnten Perzentile durch den Sicherheitsfaktor 25 geteilt. Die 90 %-Konfidenzintervalle wurden mittels Monte-Carlo-Simulation bestimmt.

TTC-Wert	Interner TTC-Wert für Cramer-Klasse I ($n=287$)	Interner TTC-Wert für Cramer-Klasse II/III ($n=1.289$)
5. Perzentil der Verteilung der NOAELs mit Bioverfügbarkeit angepasst	6,9 (3,8-11,5)	0,1 (0,08-0,14)
10. Perzentil der Verteilung der NOAELs mit Bioverfügbarkeit angepasst	38,6 (31,5-40,5)	1,5 (1,2-1,9)

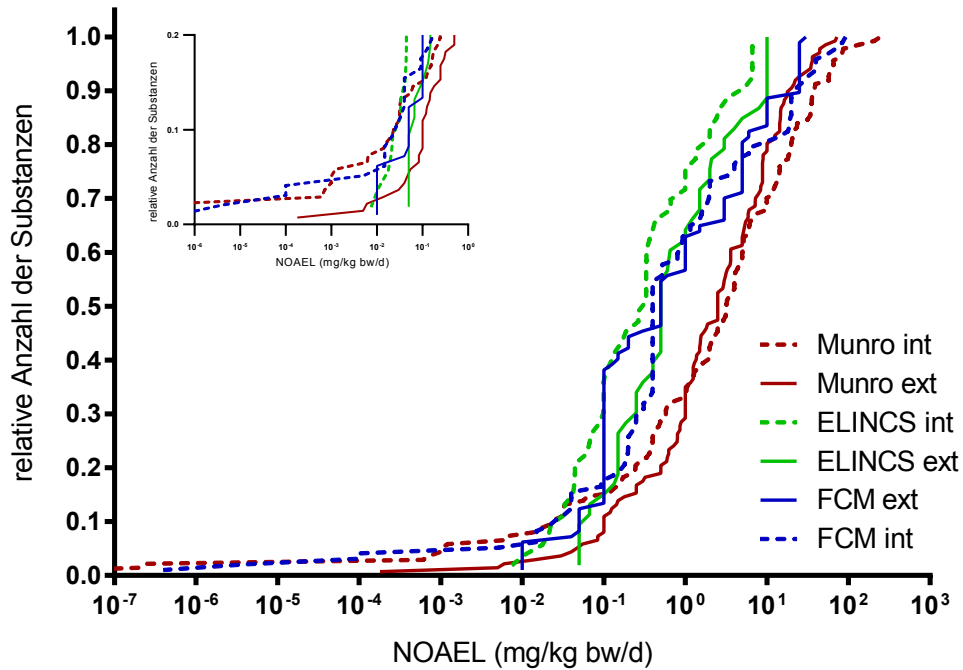
nen Werte auf $50 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$ für Klasse I und $10 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$ für Klasse II/III. Bei den internen Werten ergeben sich für Klasse I $26 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$ und für die kombinierte Klasse $0,004 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$ (Tabelle 3.3, Abbildung 3.4).

3.3.3. Gesamtdatensatz

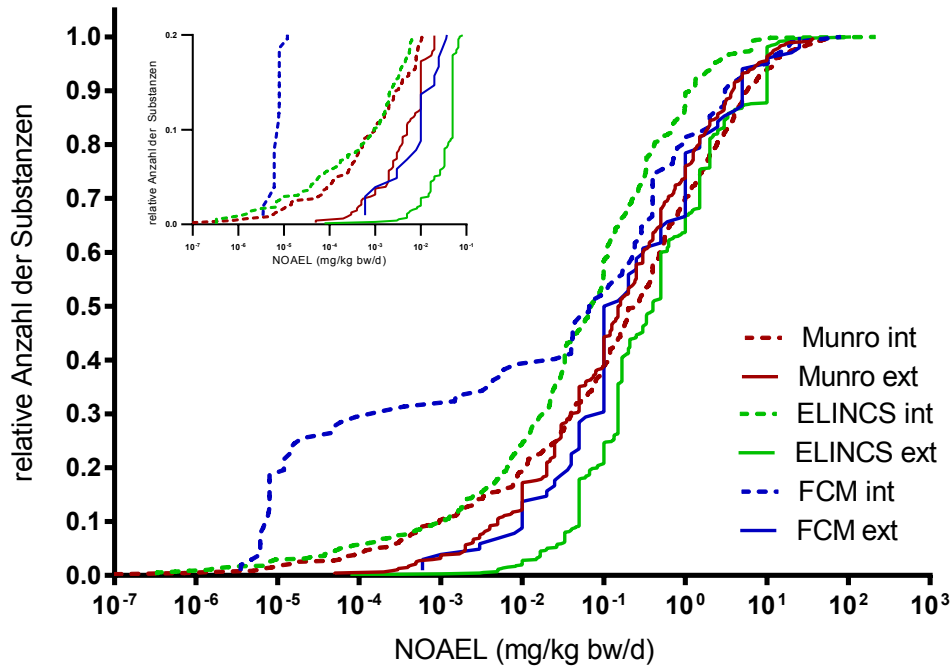
Bei Zusammenlegung aller drei Datenbanken zu einem gemeinsamen Datensatz und Aufteilung nach Cramer-Klassifikation, ergeben sich im Falle der internen TTC-Werte auf Grundlage des fünften Perzentils für Klasse I $6,9 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$ und für Klasse II/III $0,1 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$. Für das zehnte Perzentil können Werte von $38,6 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$ für Klasse I und $1,5 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$ für Klasse II/III ermittelt werden (Tabelle 3.4).

3.4. Diskussion

Eine Exposition gegenüber Chemikalien ist auf verschiedenen Wegen möglich, so etwa oral, dermal oder inhalativ. Während in den meisten Toxizitätsstudien auf oraler Verabreichung beruhen, gibt es zu anderen Expositionswegen kaum verfügbare experimentelle Daten. Insbesondere gegenüber kosmetischen Produkten sind die Anwender dermal exponiert. Da diese Produkte in der Bevölkerung eine breite Anwendung finden, und das Erheben tierexperimenteller Daten in der EU jedoch nicht mehr erlaubt ist [65], ist es hierfür von besonderem Interesse, Daten auf anderen Wegen zu generieren. Das Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung interner NOAEL-Werte, um eine *Route-to-*



(a) Empirische Verteilung der NOAELs Klasse I



(b) Empirische Verteilung der NOAELs Klasse II/III

Abbildung 3.4.: Empirische Verteilung der externen NOAELs/100 (ext) und internen NOAELs/25 (int) der Cramer-Klasse I (a) und der kombinierten Cramer-Klasse II/III (b) der drei Datenbanken Munro, ELINCS und FCM.

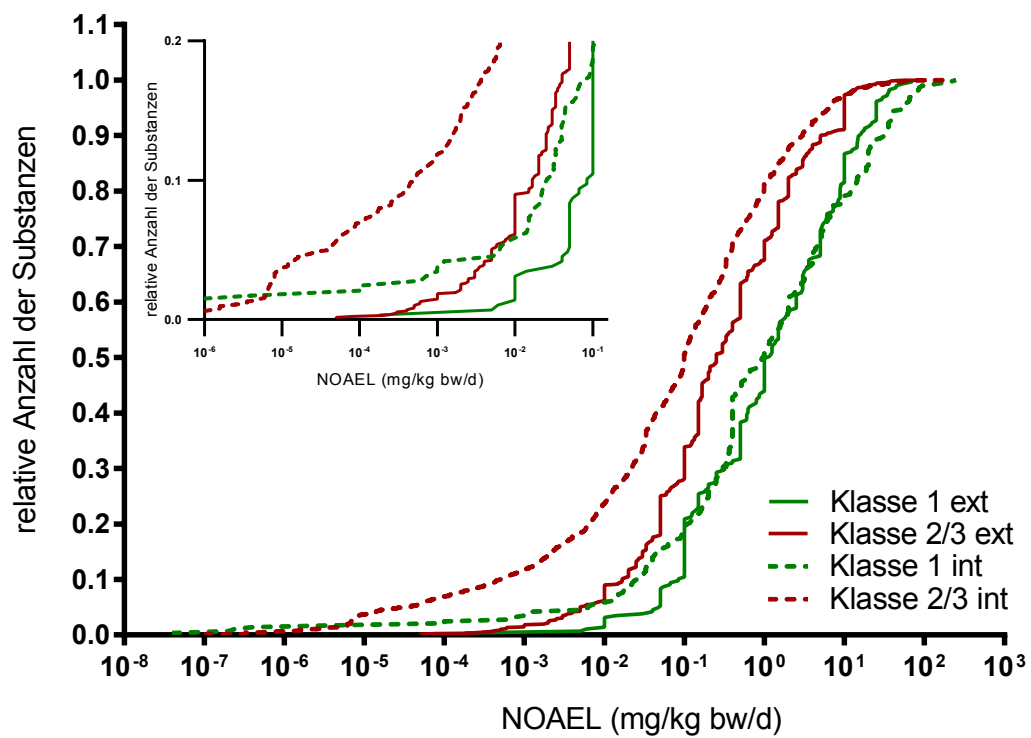


Abbildung 3.5.: Empirische Verteilung der externen NOAELs/100 (ext) und der internen NOAELs (int) von Cramer-Klasse I und der kombinierten Cramer-Klasse II/III.

Route-Extrapolation von externen oralen NOAEL-Werten auf andere Verabreichungswege (insbesondere dermale Verabreichung) zu ermöglichen. Um das zu erreichen, wurden die oralen externen NOAELs unter Berücksichtigung der oralen Bioverfügbarkeit der entsprechenden Chemikalie in interne NOAELs überführt. Prinzipiell ermöglicht die Herleitung der internen NOAELs also das Herausrechnen des Expositionsweges. Da keine experimentellen Daten zur Bioverfügbarkeit für die meisten Substanzen vorlagen, wurde eine Software zur Bestimmung der Absorption verwendet. Diese Software nutzt Algorithmen, die sich für die Vorhersage auf physikochemische Eigenschaften der Substanzen stützen, von denen man weiß, dass sie für die Absorption verantwortlich zeichnen [59].

Soweit bekannt, wurde das verwendete Tool nicht durch einen Vergleich der berechneten mit experimentell ermittelten Werten zur Bioverfügbarkeit validiert, was sicherlich einen Schwachpunkt darstellt. Hier wurde allerdings ein vergleichsweise großer Datenpool verwendet, mit annähernd 1600 chemischen Substanzen aus Industriechemikalien, Arzneimitteln und natürlich vorkommenden Stoffen mit stark unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften. Selbst wenn die Vorhersage einzelner Substanzen von experimentellen Werten abweichen, kann davon ausgegangen werden, dass eine Vorhersage der Datenbanken als Ganzes eine akzeptable Präzision aufweist, da vereinzelte Überbewertungen durch entsprechend häufig auftretende Unterbewertungen ausgeglichen werden. Davon abgesehen wurden Unsicherheitsanalysen durchgeführt unter Berücksichtigung der Daten von Reynolds et al. [58], der eine Analyse der Unterschiede zwischen vorhergesagten und publizierten Daten aus *In-vivo*-Studien vornahm. Hierzu nutzte er den Algorithmus, auf dem ACD Percepta[®] basiert.

Bei der Unsicherheitsanalyse wurde eine weitere Quelle der Unsicherheit herangezogen, um die Nutzung der Faktoren zur Zeitextrapolation zu berücksichtigen. Hier wurden die Analysen und Daten von Schneider et al. [62] verwendet. Während diese zwei Unsicherheiten berücksichtigt werden konnten, verbleibt eine Unsicherheit in Bezug auf die Herleitung der experimentellen NOAEL-Werte, die nicht korrigiert oder analysiert werden kann. Diese Unsicherheit basiert zum einen auf natürlichen Schwankungen bei Tierversuchen, vor allem aber auf dem *dose spacing*, also auf dem Abstand zwischen den verabreichten Dosierungen, auf deren Grundlage der NOAEL bestimmt wird.

Die Überführung von externen oralen NOAELs in interne TTC-Werte mittels substanzspezifischem Faktor, der durch ein *In-silico*-System bereitgestellt wird, das die Bioverfügbarkeit vorhersagt, ermöglicht eine Anpassung des herkömmlichen Sicherheitsfaktors von 100. Der toxikokinetische Teil des Sicherheitsfaktors, der 4,0 beträgt,

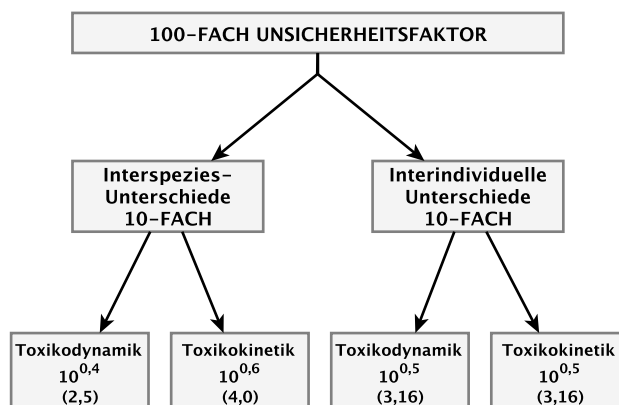


Abbildung 3.6.: Aufbau des herkömmlichen Unsicherheitsfaktors von 100. Dieser teilt sich auf in jeweils Faktor 10 für Interspezies- und interindividuelle Unterschiede. Diese können wiederum unterteilt werden in Faktoren für Toxikodynamik und Toxikokinetik. Nach [64].

(Abb. 3.6) kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, sodass sich der Sicherheitsfaktor von 100 auf 25 verringert [64].

Es wurden drei Datenbanken verwendet, für die TTC-Werte in Bezug auf die Cramer-Klassen berechnet wurden. In zwei der Datenbanken (Munro und ELINCS) wurden etwa zwei Drittel der Stoffe und bei der FCM-Datenbank in etwa die Hälfte der dritten Cramer-Klasse zugeordnet. Nur ca. 3,7% aller Chemikalien konnten durch den eingesetzten Entscheidungsbaum der zweiten Klasse zugeordnet werden. Das ist damit zu begründen, dass Klasse II der Cramer-Klassifikation nicht hinreichend exakt definiert wurde. Aufgrund des geringen Anteils der zweiten Klasse liegt es nahe, dass die empirische Verteilung ebendieser Klasse einen hohen Grad an Unsicherheit aufweist (Abb. 3.1, Tab. 3.5).

Das Problem der geringen Abdeckung von Cramer-Klasse II ist nicht neu. Bei einer Untersuchung der RepDose-Datenbank des Fraunhofer Instituts für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Hannover [17] untersuchten Escher et al. [47] insgesamt 203 Stoffe aus Tierversuchsstudien mit inhalativer Verabreichung. Eingang in die Studie fanden primär chronische, aber auch Studien mit subchronischer und subakuter Dauer, die über entsprechende Faktoren auf chronische Verabreichungsdauer extrapoliert wurden. Ausgeschlossen wurden Substanzen wie Organophosphate und solche, die *structural alerts* für genotoxische Eigenschaften hervorbrachten. Bei dieser Untersuchung konnten 68% der Datenbank Cramer-Klasse III, 29% Klasse I und nur 3% Klasse II zugeordnet werden. Diese Verteilungen spiegeln außerdem die problematischen Eigenschaften der dritten Klasse wider, einerseits sehr konservativ zu sein und dementsprechend viele Stoffe zugeordnet zu bekommen, andererseits aber auch solche

Stoffe zu enthalten, die durch den Entscheidungsbaum der Cramer-Klassen nicht erfasst werden können und im eigentlichen Sinne keiner Klasse zugehörig sind.

Tabelle 3.5.: Aufteilung der in den Datenbanken enthaltenen Substanzen in die drei Cramer-Klassen. Zusätzlich die Verteilung der RepDose-Datenbank von Escher et al. [47]. Angaben in Prozent.

	Munro	ELINCS	FCM	Gesamt	RepDose
Klasse I	22,4	6,9	48,7	18,2	28,6
Klasse II	4,5	2,1	7,1	3,7	3,4
Klasse III	73,1	91,0	44,2	78,1	68,0

Kalkhof et al. [45] zeigten auch die unzureichend genaue Klassifizierung von Cramer et al. [53] und dass sie nicht die Toxizität der Chemikalien widerspiegelt, wie sie vom Global Harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) festgelegt wird. Tabelle 3.5 zeigt die allgemein recht konservative Zuordnung der Cramer-Klassifikation. Auch der ersten Klasse, deren Substanzen als nicht toxisch gelten, werden insgesamt nur 18,2% aller Chemikalien zugeordnet, wohingegen die dritte Klasse 78,1% ausmacht. Aufgrund der mangelhaften Klassifizierung, insbesondere der zweiten Klasse, ist es ratsam, die zweite Klasse mit der dritten zusammenzulegen, wie in dieser Arbeit durchgeführt. Außerdem sollte das fünfte Perzentil der entsprechend der Bioverfügbarkeit angepassten NOAELs zur Herleitung des TTC verwendet werden, bis ein verbessertes System zur Klassifizierung chemischer Strukturen entwickelt, oder die Cramer-Klassifizierung entsprechend überarbeitet wurde. So wird etwa in einer kürzlich erschienenen Publikation von Hauge-Nilsen und Keller [66] empfohlen, weitere Strukturaktivitäts-Beziehungen sowie vorhandene Toxizitätsdaten wie akute Toxizität mit zu verwenden. Gewisse Unterschiede der Zuweisung von Stoffen zu Cramer-Klassen werden auch durch Differenzen der verschiedenen Implementierungen der Cramer-Klassifizierungen einzelner Programme untereinander bedingt. In einer kürzlich erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass die Implementierung in Toxtree, die sich im Wesentlichen an die Originalarbeit hält, Unterschiede zur ebenfalls frei erhältlichen Implementierung in der OECD QSAR Toolbox¹¹ aufweist. Von über 1000 untersuchten Stoffen wurden 16% unterschiedlichen Klassen zugewiesen. In einem Vergleich der beiden Anwendungen zum *expert judgement* schnitt Toxtree mit 83% korrekter Zuweisungen allerdings etwas besser ab als die Toolbox mit 77% [67].

¹¹Das Programm kann in der aktuellen Version unter folgender URL bezogen werden: <http://toolbox.oasis-lmc.org/?section=download&version=latest>

Dennoch zeigen auch diese Ergebnisse, dass eine Verbesserung der Algorithmen sowohl möglich als auch nötig ist.

Neben der Berechnung des fünften Perzentils wurde in dieser Arbeit auch das zehnte Perzentil der angepassten Verteilung der NOAELs ermittelt. Die Berechnung der TTC-Werte basierend auf dem fünften Perzentil ist die übliche Vorgehensweise der Entscheidung und bildet den konservativeren Ansatz, der gemeinhin als regulärer Ansatz für externe TTC-Werte gilt. Die TTC-Werte des zehnten Perzentils könnten jedoch auch als mögliche Grenzwerte in Betracht gezogen werden, da sie einen solideren Schätzwert bilden (Abb. 3.4).

Zusammenfassend sind die internen TTC-Werte erheblich niedriger als die externen TTC-Werte. Dies zeigt, dass die Bioverfügbarkeit der meisten Substanzen bei oraler Verabreichung unter 100 % liegt. Für *Route-to-Route-Extrapolation* in der Risikobewertung ist die relative Absorption der Verabreichungswege (dermal/oral) ein entscheidender Faktor und bei nicht-oralen Verabreichungswegen müssen Anpassungen hinsichtlich der systemischen Bioverfügbarkeit gemacht werden. Daher ist es nötig, bei der Übertragung des TTC-Ansatzes auf andere Verabreichungswege interne TTC-Werte anstelle von externen zu verwenden, wie es schon von verschiedenen Ausschüssen der Europäischen Union gefordert wurde [51].

Die Anwendung interner TTC-Werte könnte darüber hinaus auch der präziseren Definition von Begriffen wie ‘no relevant human exposure’, ‘no significant exposure’ oder ‘negligible absorption’ dienen. Die Begriffe ‘no relevant human exposure’ und ‘no significant exposure’ werden zwar in der REACH-Verordnung verwendet, aber nicht eindeutig definiert (Regulation (EC) No 1907/2006). Die Verordnung sieht jedoch vor, dass eine Anpassung der Vorgaben möglich ist, sofern ‘no relevant human exposure’ oder ‘no significant exposure’ gegeben ist.

Wenn also die menschliche externe Exposition und deren Absorption bestimmt wurden, ist es möglich, die interne Exposition zu bestimmen und diese mit den internen TTC-Werten aus den Datenbanken dieser Arbeit zu vergleichen. Diese Abschätzung könnte eine Möglichkeit sein, auf einige Tests, wie Toxizitätstests mit wiederholter Gabe, zu verzichten (*waving toxicity testing*).

Die Idee, interne TTC-Werte zu entwickeln, wurde schon in mehreren Publikationen angeregt. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse aus drei verschiedenen Datenbanken mit nicht-kanzerogenen NOAELs unterschiedlicher Chemikalien und einem *In-silico*-Ansatz zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit aufgezeigt. Es lässt sich daraus herleiten, dass interne Expositionen, die unterhalb des internen TTC-Grenzwertes liegen, als ‘no relevant human exposure’ oder ‘no significant exposure’ gemäß der REACH-Verordnung gelten können.

4. Kinetik

4.1. Physiologisch basiertes kinetisches Modelling

Physiologisch basiertes kinetisches Modelling (PBTK) wurde erstmals 1937 durch Teorell mit einigen mathematischen Modellen eingeführt [68, 69]. Aufgrund des erforderlichen erheblichen Aufwands, um die komplexen mathematischen Gleichungen zu lösen, wurde es allerdings wenig angewendet und die Weiterentwicklung war langsam. Mit Einführung der Computertechnik, die dem Anwender die Rechenarbeit abnehmen konnte, sollte kinetisches Modelling allerdings zunehmend an Einfluss gewinnen. In der Pharmakokinetik hat sich ein Vorgehen mit experimentellen Studien, die eine große Anzahl von Daten produzieren, etabliert. In der Toxikokinetik haben physiologisch basierte kinetische Modelle einen besonderen Stellenwert und wurden in den letzten Jahren als ein wertvolles Tool zur Modellierung von Konzentrationen in Zielorganen und als wichtiger Baustein in einem *Mode-of-Action*-Ansatz zu Erklärung toxischer Phänomene erkannt. Physiologisch basiertes kinetisches Modelling bedarf eines systemischen Ansatzes, der die physiologischen Prozesse der Kinetik in einem strukturellen und einem mathematischen Modell darstellen kann. Darüber hinaus bedarf es einer Programmierung, die die zur Lösung erforderlichen numerischen Algorithmen flexibel zur Anwendung bringen kann. In einem sog. *Bottom-up*-Ansatz werden die einzelnen stoffspezifischen Parameter in voneinander unabhängigen, oft *In-vitro*- oder *In-silico*-Systemen, bestimmt und in das Modell des gesamten Körpers eingebacht. Diese Modelle haben den großen Vorteil, dass aus der Kenntnis physiologischer Prozesse die Auswirkung von Änderungen der Physiologie (z.B. altersabhängige Einflüsse auf den Fremdstoffmetabolismus) auf die Konzentrations-Zeit-Verläufe der Substanzkinetik und auch auf einzelne Organe vorhergesagt werden können. In Verbindung mit Dosis-Wirkungsmodellen ermöglichen sie somit eine Vorhersage über den zu erwartenden Effekt bzw. das Effektausmaß. Neben der Implementierung individueller Variabilität, die das Verhalten des Metabolismus in der breiten Bevölkerung über alle Altersstufen und Besonderheiten vorhersagen kann, gewinnen strukturelle Modelle für die Vorhersage von Konzentrations-Zeit-Verläufen in intrazellulären Organellen als den Strukturen, die mit den Wirkungsmechanismen verknüpft sind, aufgrund fortschreitender Entwicklung zunehmend an Einfluss. Dies gilt

auch für die Modellierung des Zeitverlaufs der Konzentrationen in *In-vitro*-Systemen. Dieser Ansatz geht von der Vorstellung aus, dass der toxische Effekt stärker mit dem Konzentrations-Zeit-Verlauf am Ort der Wirkung gekoppelt ist, als mit der Exposition, gemessen in Lebensmitteln oder der Luft am Arbeitsplatz. Die Weiterentwicklung dieser Ansätze in einer interdisziplinär arbeitenden Gruppe ist vielversprechend für die Verbesserung von *Mode-of-Action*-Ansätzen und *In-vitro*-Systemen und bildet ein Standbein für eine genauere Risikobewertung [1].

4.2. Alkohol

4.2.1. Einleitung

Alkohole haben vielfältige Einsatzmöglichkeiten. Sie dienen als organische Lösemittel, Reinigungs- und Desinfektionsmittel und als Ausgangsstoff bei chemischen Synthesen. Der aliphatische, einwertige Alkohol Ethanol ist darüber hinaus Genussmittel. Ethanol entsteht aus Vergärung von Sacchariden und kann durch Destillation zu beliebigen Konzentrationen gebracht werden. Der jährliche Pro-Kopf-Verbrauch an reinem Ethanol liegt in der Bundesrepublik bei etwa 11 Litern. Bier steht an erster Stelle der konsumierten alkoholischen Getränke. Im Jahr 2005 wurden pro Kopf 111 Liter Bier konsumiert, gefolgt von 20,32 Litern Wein, 3,78 Litern Sekt und 4,9 Litern Spirituosen [70]. Unbestritten ist die Tatsache, dass das Trinken von Alkohol während der Schwangerschaft mit einem massiven gesundheitlichen Risiko für das Ungeborene einhergeht. Kinder, die während der Schwangerschaft Alkohol ausgesetzt waren, leiden unter Alkoholembyopathie, auch als Fetales Alkoholsyndrom (FAS) bekannt. Charakteristisch für dieses Syndrom sind intrauteriner Minderwuchs, Mikrocephalus, Hypoplasie des Unterkieferknochens, Fehlbildungen der Organe sowie psychomotorische Retardierungen. In verschiedenen Studien konnten bereits bleibende kognitive Schäden sowie Verhaltensauffälligkeiten bei Kindern beobachtet werden, deren nicht alkoholranke Mütter während der Schwangerschaft regelmäßig moderate Dosen Alkohol (etwa 60 g pro Woche) konsumiert hatten [71, 72]. Die kausale Therapie einer erworbenen Embryopathie ist nicht möglich. Häufigste Ursache für FAS ist chronischer Alkoholabusus der Mutter. Bei einer Schätzung aus dem Jahr 2009 ging man von 1,3 Millionen alkoholkranken Männern und Frauen in Deutschland aus [73]. Das Risiko für FAS ist bei chronischem Konsum großer Mengen Alkohol während der Schwangerschaft am größten. Es ist zwar davon auszugehen, dass das Schädigungsmaß in Abhängigkeit der Dosis steht, eine Risikogrenze lässt sich aus vorhandenen Daten jedoch nicht ableiten [74]. Insofern ist es

empfehlenswert, während der Schwangerschaft vollends auf den Konsum von Alkohol verzichten.

Eine einheitliche Empfehlung, wie vorzugehen sei, wenn nach der Schwangerschaft während des Stillens einmal Alkohol getrunken wurde, gibt es hingegen nicht. Da Alkohol in die Frauenmilch übergeht, existieren zahlreiche Empfehlungen verschiedener Gruppen, die ebenfalls davon abraten, während des Stillens Alkohol zu trinken. Sollte doch einmal Alkohol konsumiert worden sein, so liest man von Stillberaterinnen und in Foren im Internet Ratschläge, wie vorzugehen sei: Abpumpen der Milch vor der Alkoholaufnahme und für die nächste Mahlzeit des Kindes aufbewahren. Darüber hinaus sollte die Milch direkt nach dem Alkoholgenuss ebenfalls abgepumpt und anschließend verworfen werden [75]. Bemerkenswerterweise gab es früher sogar entgegengesetzte Empfehlungen. Man ging davon aus, dass Alkoholgenuss der Mutter während des Stillens entspannend wirke, die Laktation fördere und den Säuglingen beim Einschlafen helfe [76].

Das Thema war auch schon im 19. Jahrhundert aktuell und wurde immer wieder kontrovers diskutiert. In dem *Buch vom gesunden und kranken Menschen* von Carl Ernst Bock aus dem Jahr 1898 [77] heißt es „Alkoholische Getränke in mäßigen Mengen sind nicht gerade verboten, doch keineswegs notwendig, auch nicht das bei den Ammen so beliebte Bier.“ Im *Hausbuch der Frau* aus dem Jahr 1957 [78] heißt es hingegen „...hüten Sie sich jedoch vor Überanstrengungen, vor Alkohol und rauchen sie nicht zu viele Zigaretten.“ Einige Jahre später fand man Hinweise darauf, dass Alkohol einen inhibitorischen Effekt auf das Einschießen der Milch haben kann [79]. Diese Beobachtung wird heute mit einer durch den Alkohol verursachten verminderten Oxycodin-Ausschüttung in Verbindung gebracht, was eine reduzierte Milchejektion zur Folge hat [80].

Amtliche Vorschläge finden keinen gemeinsamen Konsens. In Frankreich vertritt man die Meinung, dass „gelegentlich 1 bis 2 Gläser Wein“ [81] mit keinerlei Beeinträchtigungen für den Säugling verbunden seien. Ähnlich lautet eine Empfehlung aus Kanada: „kein exzessives oder tägliches Alkoholtrinken, gelegentlicher Konsum ohne schädliche Wirkung für das Kind“ [82]. Demgegenüber stehen allerdings Empfehlungen aus der Schweiz, die dazu aufrufen, auf Alkohol während des Stillens grundsätzlich zu verzichten [83]. Die *Australian Breastfeeding Association* hat die Meinung zu dem Thema etwas entschärft. Während es in einer früheren Stellungnahme von 2009 hieß, man solle einen abgepumpten Milchvorrat anlegen [75], heißt es in einem aktuellen Infoblatt von 2014, dass bis zu zwei „Standarddrinks“ vertretbar wären, da Frauenmilch mit geringem Anteil Alkohol besser als künstliche Säuglingsmilch sei [84]. Das *Australian Government & National Health and Medical Research Council* bleibt hingegen bei der Empfehlung, sich einen Vorrat an Milch anzulegen. [85].

Diese uneinheitlichen Empfehlungen geben den betroffenen Müttern nicht das Gefühl der Sicherheit und umfangreich informiert zu sein. Dies wäre allerdings hilfreich, denn laut einer aktuellen Studie von 2014, konsumieren etwa die Hälfte aller stillenden Mütter der westlichen Welt Alkohol [76]. Laut Bundesinstitut für Risikobewertung ist der Wunsch der Mütter, in der Stillzeit Alkohol oder Kaffee zu trinken, ein häufiger Grund, sich gegen das Stillen zu entscheiden, oder früher als empfohlen abzustillen [86]. Die Vorgehensweise des Abpumpens von Milch wäre allerdings nur dann berechtigt, wenn nach dem Alkoholgenuss der Mutter die vom Kind mit der Muttermilch aufgenommene Menge Alkoholkonzentrationen im Blut hervorriefen, die schädigende Wirkungen auf relevante Gewebe, wie das Gehirn, hätten.

Durch physiologisch basiertes Modelling ergibt sich die Möglichkeit, bereits bestehende Kenntnisse zur Physiologie wie Körpergewicht, Organengewichte, Blutflüsse durch Organe in verschiedenen Lebensaltern und unterschiedliche Metabolisierungskapazität (Tab. 4.1) einerseits und Kenntnisse über den Stoff, in diesem Fall Alkohol, andererseits in einem Modell zusammenzuführen und das Verhalten des untersuchten Stoffes im Körper zu simulieren.

Zur Überprüfung der Validität des Modells können die simulierten Daten mit entsprechenden experimentellen Daten bezüglich des Verhaltens des Stoffes im menschlichen Körper überprüft werden. Ist ein entworfenes Modell einmal validiert, so kann es ohne größere Probleme an verschiedene Vorgaben angepasst werden. Das ermöglicht es, das Verhalten des Stoffes unter verschiedenen Szenarien und mit unterschiedlichen Dosierungen zu untersuchen.

Für diese Aufgabe wurden zwei physiologisch basierte toxikokinetische Modelle für Alkohol aufgestellt. Eines der Modelle wurde in zwei Submodelle unterteilt. Die beiden Submodelle simulierten die physiologischen Eigenschaften der Mutter und die eines Säuglings, die miteinander verbunden waren. Mit Hilfe dieses Modells war es möglich, Alkoholkonzentrationen in Blut, Leber und Gehirn nach Aufnahme verschiedener alkoholhaltiger Getränke für die Mutter einerseits und unter Annahme verschiedenen Stillverhaltens für ein wenige Tage altes Neugeborenes und einen drei Monate alten Säugling andererseits, zu berechnen. Zusätzlich wurde zum Vergleich berechnet, welche Alkoholkonzentrationen bei den beiden genannten unterschiedlich alten Säuglingen im Blut und den Organen erreicht werden, wenn diese entsprechend den Dosierungsangaben mit Carminativum Hetterich® (Madaus, Köln) behandelt wurden. Das Präparat ist ein für Säuglinge empfohlenes pflanzliches Arzneimittel zur Behandlung von Blähungen. Ein weiteres Modell simuliert die kindliche Exposition gegenüber Alkohol *in utero*. Die hieraus erhaltenen Ergebnisse erlauben es, eine Risikoabschätzung für einen gegenüber Alkohol in der Muttermilch exponierten Säugling vorzunehmen.

4. Kinetik

Tabelle 4.1.: Anatomische und physiologische Daten eines Neugeborenen, wie sie zur Erstellung des Modells verwendet wurden, und eines durchschnittlichen männlichen Erwachsenen (nach [87]).

Alter	Neugeborenes	männlicher Erwachsener
Körpergewicht (kg)	3,5	73,0
Körperhöhe (cm)	51,0	176,0
Körperoberfläche (m ²)	0,24	1,9
Herzminutenvolumen (l/min)	0,73	6,5
Organgewichte (g)		
Blut	290	5600
Fettgewebe	930	18 200
Leber	130	1800
Gehirn	380	1450
Niere	25	310
Muskel, Haut	975	32 300
weitere gefäßreiche Organe	204	3768
Skelett (ohne Knochenmark)	320	9330
Summe Organgewichte	3254	72 758
Relative Lebermasse (g/KG)	37	25
Relative Masse Fettgewebe (g/KG)	266	249
Metabolismus-Faktor	0,14	1
Blutflussraten (l/h)		
Fettgewebe	1,7	19,5
Gehirn	11,4	46,8
Niere	7,1	74,1
Muskel, Haut	5,0	85,8
weitere gefäßreiche Organe	5,7	56,5
Skelett (ohne Knochenmark)	0,5	7,8
Leber	12,6	99,5

Tabelle 4.2.: Die Trinkszenarien der Mutter (nach aufsteigender Alkoholmenge) mit unterschiedlichen Getränken verschiedenen Alkoholgehalts. Für das Modell wurden die reinen Alkoholmengen berücksichtigt. Hierbei wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass 1 g/l einer Alkoholkonzentration von 1 ‰ entspricht.

Getränk	Alkoholgehalt (%)	Trinkvolumen (l)	Alkoholmenge (g)	Trinkdauer (min)
0,0‰-Bier	0,01	0,5	0,05	60
Säfte	0,08	0,5	0,4	60
Alkoholfreies Bier	0,5	0,5	2,5	60
Sekt	11,0	0,1	11,0	30
Bier	5,0	0,5	25,0	60
Wein	13,0	0,25	32,5	30

4.2.2. Methoden und Ergebnisse

Zunächst wurde ein physiologisch basiertes Modell von Mutter und gestilltem Kind aufgestellt. Mit Hilfe des Modells wurde das Konzentrations-Zeit-Profil vom Alkohol in Blut, Leber und Gehirn nach Aufnahme verschiedener Dosen Alkohol durch die Mutter mit anschließendem Stillen simuliert. Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 zeigen die verwendeten realitätsnahen Szenarien des Alkoholtrinkens und des Stillens. Die verwendeten physiologischen Parameter (Tabelle 4.1) wurden aus Abraham et al. [87] entnommen. Das verwendete Modell basiert in seiner Struktur auf Modellen für Erwachsene sowie Neugeborene und Säuglinge, die schon zuvor Verwendung fanden [87, 88, 89], allerdings modifiziert wurden. Für die stillende Frau wurde ein weiteres Kompartiment, das die Brust repräsentiert, und für die schwangere Frau eines, das den Fetus *in utero* repräsentiert, hinzugefügt. Auch das Modell für die Säuglinge unterschiedlichen Alters wurde schon zuvor genutzt. Einerseits für Modelle mit inhalativer Aufnahme [87, 90], andererseits für Modelle oraler Aufnahme [88, 89, 91]. Da keine physiologischen Daten für die Altersgruppe eines 3-monatigen Säuglings publiziert sind, wurde in diesem Modell von dem Neugeborenen mit einem Skalierungsfaktor von 1,7 auf das 3 Monate alte Kind hochgerechnet. Der Faktor ergibt sich als Mittelwert zwischen den Daten des Neugeborenen und eines 1/2-jährigen Säuglings.

Die stillende und schwangere Mutter wird in dem Erwachsenen-Modell als menschlicher Körper beschrieben, der aus neun Organen/Geweben zusammengesetzt ist. Die Organe sind untereinander durch arteriellen Zufluss und venösen Abfluss verbunden und werden als Kreislaufsystem durch Herz und Lunge geschlossen. Das Säuglingsmodell ist im wesentlichen eine Kopie des Erwachsenenmodells, mit dem Unterschied, dass

4. Kinetik

Tabelle 4.3.: Die Still Szenarien des Neugeborenen und des dreimonatigen Säuglings.

Lebensalter	Stillfrequenz	Stilldauer (min)	Stillvol. (ml)	Stillvol./Tag (ml)	Zeit zwischen Stillen und Ende der Alkoholaufnahme (Std.)
wenige Tage altes Neugeborenes	alle 2 Std.	30	50	600	0 (0,5 für Wein und Sekt)
3 Monate alter Säugling	alle 3 Std.	30	90	720	0 (0,5 für Wein und Sekt)

Tabelle 4.4.: Dosierung des Carminativums an einen neugeborenen und einen drei Monate alten Säugling.

	Einzeldosis in Tropfen	Einzeldosis Alkohol	Dosierung pro Tag
Neugeborenes (wenige Tage alt)	5 Tropfen	46 mg	3 mal
3 Monate alter Säugling	10 Tropfen	92 mg	3 mal

hier nur 8 Organe/Gewebe implementiert sind, da das Kompartiment des Brustgewebes hier überflüssig ist. Die beiden Modelle des Erwachsenen und des Säuglings sind miteinander verbunden. Der Ausgang aus der Brust, der die Milchproduktion repräsentiert, geht in ein Reservoir, aus dem durch intermittierendem Zufluss („Stillen“) die Alkoholübertragung in das Säuglingsmodell erfolgt (Abb. 4.1). Physiologische Parameter wie Organgewichte und Blutflüsse (Tab 4.1) wurden aus Abraham et al. [87] entnommen und basieren auf den Angaben aus dem Handbuch der *International Commission on Radiological Protection* [92].

Alkohol ist eine niedermolekulare, mittelgradig lipophile Substanz mit einem Molekulargewicht von 46 g/mol und einem logP von 4. Aufgrund dieser physikochemischen Eigenschaften kann die Verteilung des Stoffes gut durch einen Diffusionsprozess beschrieben werden, der nur durch die Gewebsdurchblutung limitiert ist. Gleichung 4.1 beschreibt die Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit in Geweben ohne Metabolismus.

$$V_T \frac{d}{dt} C_T = Q_T (C_A - C_{VT}) \quad (4.1)$$

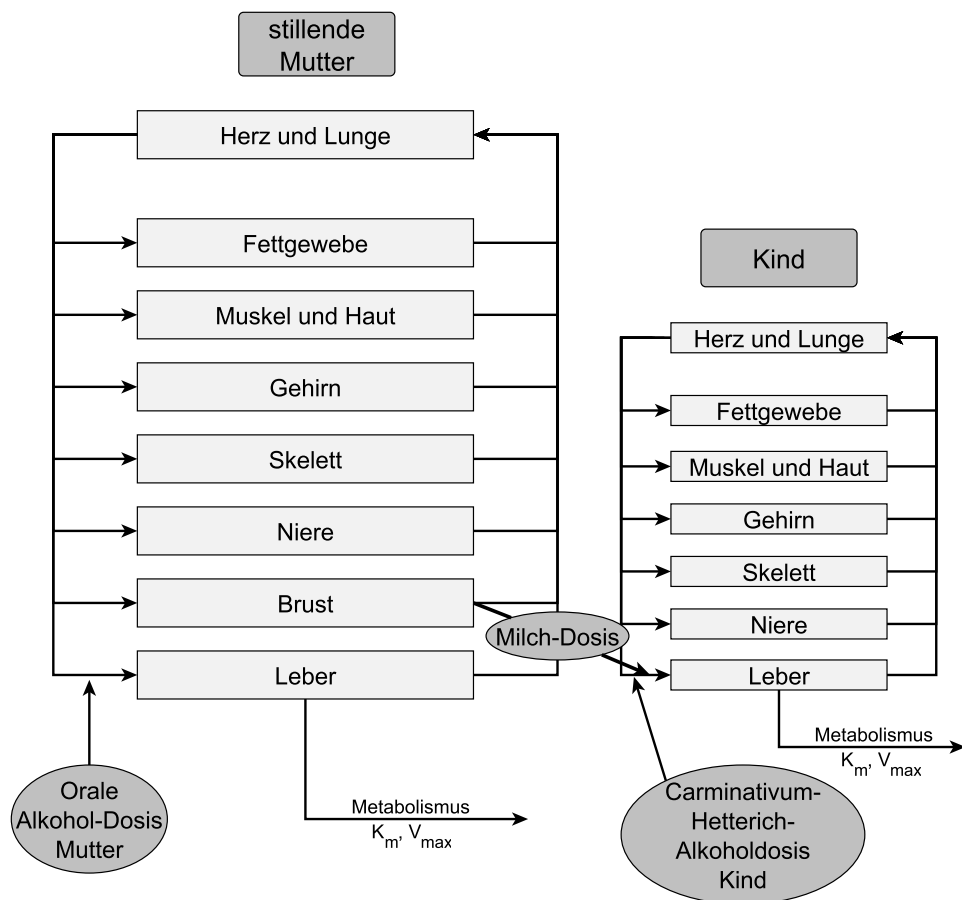


Abbildung 4.1.: Struktur des physiologisch basierten Modells der stillenden Mutter und ihres Kindes. Das Säuglingsmodell entspricht dem des Erwachsenen, allerdings ohne das Kompartiment der Brust.

4. Kinetik

Hierbei stellen V_T das Volumen des Gewebes T dar, C_T die Konzentration im Gewebe, Q_T den Blutfluss durch das Gewebe und C_A die Konzentration im arteriellen Blut. C_{VT} beschreibt die Konzentration im venösen Blut und ist der Quotient aus C_T und dem Verteilungskoeffizienten (P_T) zwischen Gewebe und Blut (Gleichung 4.2).

$$C_{VT} = \frac{C_T}{P_T} \quad (4.2)$$

Formel 4.3 beschreibt dem gegenüber die Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit in metabolisierendem Gewebe. In diesem Fall wird das entsprechende Gewebe durch die Leber repräsentiert.

$$V_T \frac{d}{dt} C_T = Q_T (C_A - C_{VT}) - RAM \quad (4.3)$$

Aufbau und Parameter sind die gleichen wie bei Formel 4.1, allerdings verfügt die Leber als metabolisierendes Organ noch über die Ausscheidung des Alkohols (RAM - Rate of Amount Metabolized). Diese wurde als Metabolismus in der Leber mittels Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben (Gleichung 4.4) mit V_{max} entsprechend der maximalen Umsatzrate und K_m als die Konzentration im venösen Blut, bei der die Umsatzrate $1/2V_{max}$ beträgt.

$$RAM = V_{max} \cdot \frac{C_L}{P_L \cdot K_m + C_L} \quad (4.4)$$

C_L beschreibt die Konzentration in der Leber und P_L den Verteilungskoeffizienten für das Organ. Die Leber gilt in dem Modell als ausschließliches Stoffwechselorgan, sodass andere Kompartimente im Hinblick auf den Metabolismus nicht weiter berücksichtigt wurden. Ein vom Metabolismus unabhängiger Substanzverlust erfolgt im Brustgewebe der Mutter. Die Milchproduktion des Gewebes wird als kontinuierlich beschrieben. Für das Verhältnis der Alkoholkonzentration von Blut/Milch wurde gemäß experimenteller Daten mit 1 gerechnet [79, 93, 94]. Für die Simulation des Konzentrations-Zeit-Verlaufs des Alkohols im Neugeborenen nach Gabe eines pflanzlichen Carminativums wurde den angegebenen Dosierungsempfehlungen entsprochen. Dies sind fünf Tropfen für das Neugeborene und zehn Tropfen für den drei Monate alten Säugling, jeweils drei mal täglich. Das Phytotherapeutikum enthält 34 % Alkohol und ein Tropfen hat ein Volumen von 30 μ l. Die Gabe erfolgt direkt in den Säugling (Tab. 4.4). In dieser Simulation wurde bei der Mutter keine Alkoholaufnahme angenommen.

Eine Verteilung der Substanzen zwischen Gewebe und Blut kann auf zwei verschiedene Weisen ermittelt werden. Zum einen ist ein experimenteller Ansatz möglich, bei dem die Verteilungen gemessen werden, zum anderen kann eine mathematische Ermittlung erreicht werden. Hier wurde eine Berechnung der Verteilung zwischen Gewebe und Blut gemäß Schmitt [95] durchgeführt. Für das Verfahren nach Schmitt sind verschiedene stoffspezifische Parameter nötig. Diese sind der Oktanol-Wasserkoeffizient LogP , der Partitionskoeffizient zwischen Phospholipiden und Wasser LogMA (*Membrane Affinity*), die Dissoziationskonstante zwischen einer Substanz und humanem Serumalbumin (HSA) LogHSA , der nicht-proteingebundene Anteil f_u (*fraction unbound*) und die Dissoziationskonstante pKa . Sofern Daten zu LogMA und LogHSA nicht zur Verfügung stehen, können sie näherungsweise über die übrigen Parameter bestimmt werden. Nach Eingabe der Daten erhält man Partitionskoeffizienten für Fettgewebe, Knochen, Gehirn, Darm, Herz, Niere, Leber, Lunge, Muskel, Pankreas, Haut, Milz, Magen, Testis, Thymus und rote Blutkörperchen. Die Koeffizienten für die benötigten Gewebe wurden in das Modell übertragen.

Die metabolischen Parameter K_m und V_{\max} , die den Alkoholabbau durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd beschreiben, wurden aus der Arbeit von Schipphan et al. [96] für Säuglinge übernommen und für die Mutter aus Baratona et al. [97]. Weitere Stoffwechselwege, wie Metabolismus über CYP2E1 oder Katalase oder unveränderte Elimination über die Niere, wurden aufgrund vernachlässigbarer Mengen nicht berücksichtigt. Das Enzym CYP2E1 erreicht erst bei hohen Alkoholkonzentrationen, wie sie bei Alkoholabusus auftreten, eine nennenswerte metabolische Kapazität [98].

Im Menschen sind mindestens fünf Untereinheiten der Alkoholdehydrogenase bekannt. In diesem Modell wurden jedoch gemeinsame Werte für die Parameter K_m und V_{\max} verwendet. Davon abgesehen übernimmt die Rolle des Ethanolstoffwechsels in der Leber im Wesentlichen nur die Klasse I ADH. Die orale Halbwertszeit wurde mit 20 Minuten angenommen, gemäß den maximalen Plasmakonzentrationen publizierter Daten [99]. Eine prähepatische Elimination des Alkohols in Magen und Dünndarm wurde ebenso nicht berücksichtigt, da die Dosis durch diesen Prozess lediglich um 4,6-13,7% verringert wird [100]. Die Absorption des Alkohols wurde mit 100% angenommen. Das entspricht einer geringen Überschätzung, wodurch eine größere Menge Alkohol die Leber erreicht und es kommt in Folge dessen zu einer Überschätzung der Alkoholkonzentration im Blut. Für die Simulation wurden die Trinkszenarien der Mutter, bei der verschiedene alkoholische Getränke in gegebener Menge und Zeit aufgenommen werden (Tab. 4.2) und der Vorgang des Stillens mit definierter Stillfrequenz, Stilldauer und aufgenommenem Milchvolumen (Tab. 4.3) verwendet. Da der toxisch relevante Meta-

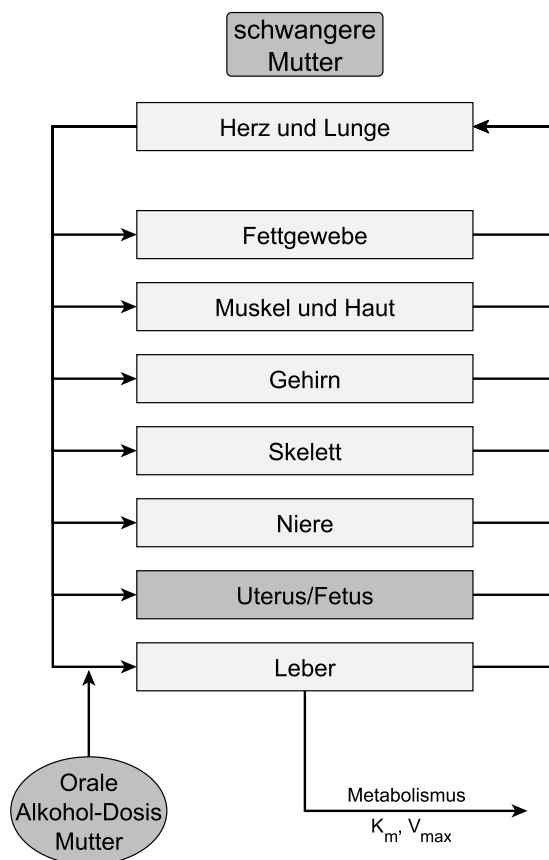


Abbildung 4.2.: Struktur des Modells der schwangeren Mutter und des Uterus/Fetus.

bolit des Ethanols, der Acetaldehyd, nicht in die Milch übergeht [79, 101], wurde dieser Vorgang im Modell nicht berücksichtigt.

Das Erwachsenen-Modell der schwangeren Frau ist im Wesentlichen identisch zu dem Modell der stillenden Mutter und aus neun verschiedenen Organen/Geweben aufgebaut, die untereinander durch arteriellen und venösen Blutfluss miteinander verbunden sind. Das Brustgewebe der stillenden Mutter wurde bei der Schwangeren jedoch durch ein alternatives Kompartiment, den Uterus, ersetzt. Dieses Kompartiment ersetzt in dem Modell als Gesamtorgan auch Placenta und Fetus (Abb. 4.2).

Die benötigten Daten zu Uterusgewicht, inklusive Placenta und Fetus (16. Woche) stammen ebenfalls aus dem Handbuch der *International Commission on Radiological Protection* [92]. Die Verteilung Blut/Uterus wurde modelliert wie die Verteilung zwischen Blut und Leber. Die weiteren Parameter wurden aus dem Erwachsenen-Modell der stillenden Mutter übernommen.

Für die Berechnung des Modells wurde die Software MATLAB[®] von MathWorks Inc. verwendet.

4. Kinetik

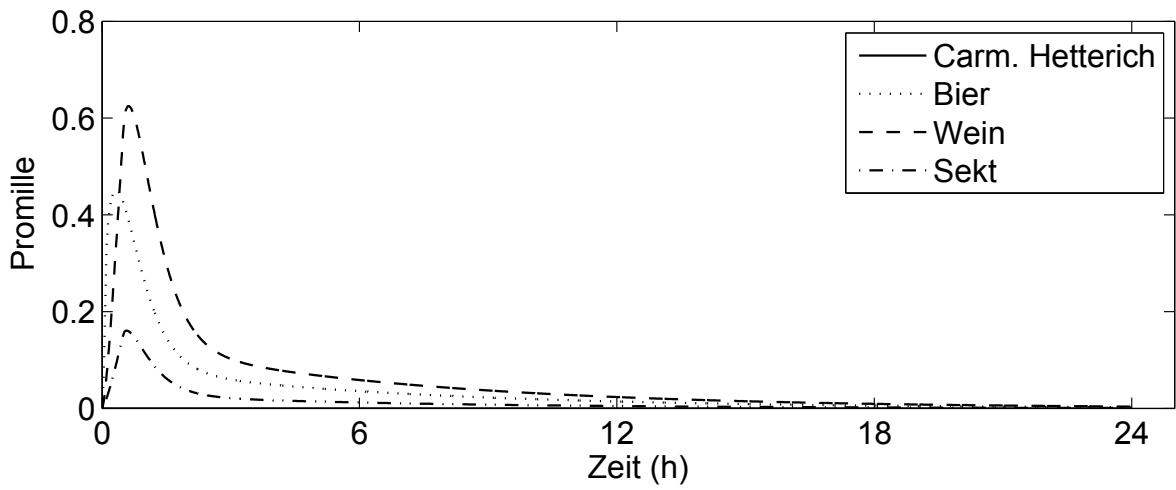
Zur Validierung des Modells der stillenden Mutter wurden die modellierten Daten mit experimentellen Daten einer Studie von Silva et al. [102] verglichen.

Zunächst wurde das Szenario im Neugeborenen berechnet. Nach Aufnahme von 0,25 l Wein (12,5 %) der Mutter über einen Zeitraum von 30 Minuten wurde eine Spitzenkonzentration im Blut der Mutter von 0,63 g/l (entspricht 0,59 ‰) 37 Minuten nach Beginn des Trinkens berechnet. Unter Annahme des *worst case*, erfolgte das Stillen unmittelbar im Anschluss an die Alkoholaufnahme. In diesem Fall ergab sich bei dem Neugeborenen eine Spitzenkonzentration von 0,003 g/kg (0,0028 ‰) nach dem ersten und 0,0035 g/kg (0,003 ‰) nach dem zweiten Stillvorgang. Ab dem dritten Stillvorgang nahmen die Konzentrationen im Neugeborenen wieder ab. Der Abstand der einzelnen Stillvorgänge betrug in der Simulation jeweils 2 Stunden (Abb. 4.3). Bei dem drei Monate alten Säugling wurde das selbe Trinkszenario angenommen, allerdings wurde die Stillfrequenz von 12 auf 8 mal täglich gesenkt, was einem Stillvorgang alle drei Stunden entspricht. In diesem Modell lag die Spitzenkonzentration (C_{\max} bei 0,004 g/kg (0,0038 ‰) nach dem zweiten Stillen. Auch hier sanken die Spitzenkonzentrationen ab dem dritten Stillvorgang wieder (Abb. 4.4). Aufgrund der deutlich niedrigeren Alkoholmengen der weiteren Getränke (0,1 l Sekt, 0,5 l alkoholfreies Bier, 0,5 l Saft und 0,5 l 0,0 ‰-Bier) ergaben sich entsprechend sehr geringe Spitzenkonzentrationen in Blut und Gewebe, sodass diese Getränke in den Abbildungen nicht berücksichtigt wurden (Tabelle 4.5).

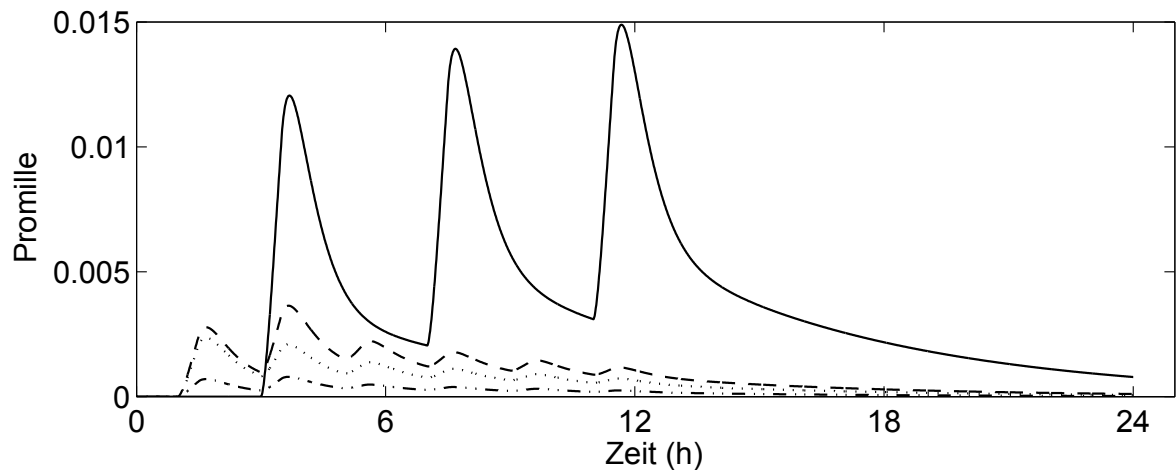
Die Konditionen der stillenden und schwangeren Mutter, also Aufnahme der Alkoholmengen und Zeitraum der Aufnahme waren absolut identisch und führten somit bei den Müttern zu gleichen Konzentrationszeitverläufen. Allerdings liegen die simulierten Maximalkonzentrationen im Uterus/Fetus der Schwangeren um zwei Größenordnungen höher als im Blut der gestillten Säuglinge (Bier: 0,0023 ‰ im Neugeborenen, 0,23 ‰ im Feten; Tab. 4.5, Abb. 4.5).

Nach Gabe des pflanzlichen Arzneimittels Carminativum Hetterich[®] zur Linderung von Beschwerden bei Blähungen in einer empfohlenen Dosierung von 3 x 5 Tropfen/Tag für Neugeborene und 3x 10 Tropfen/Tag bei dem drei Monate alten Säugling ergaben sich deutlich höhere Alkoholkonzentrationen in Blut und Gehirn als durch die Aufnahme des Alkohols über die Muttermilch. Bei dem Neugeborenen wurde eine Spitzenkonzentration von 0,015 g/kg (0,0141 ‰) erreicht, bei dem älteren Säugling die selben Konzentrationen wie bei dem Neugeborenen (Abb. 4.3, 4.4 und Tab. 4.5).

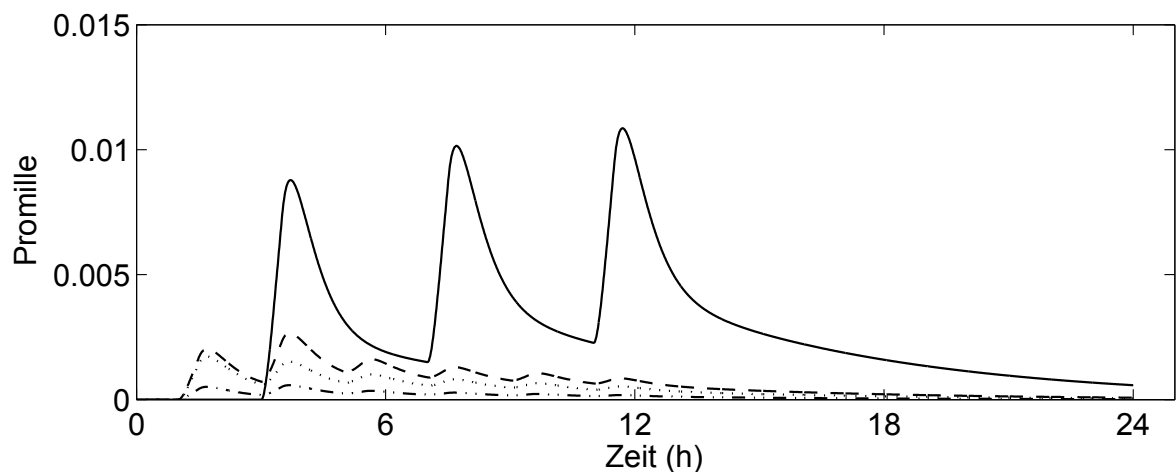
4. Kinetik



(a) Blut stillende Mutter



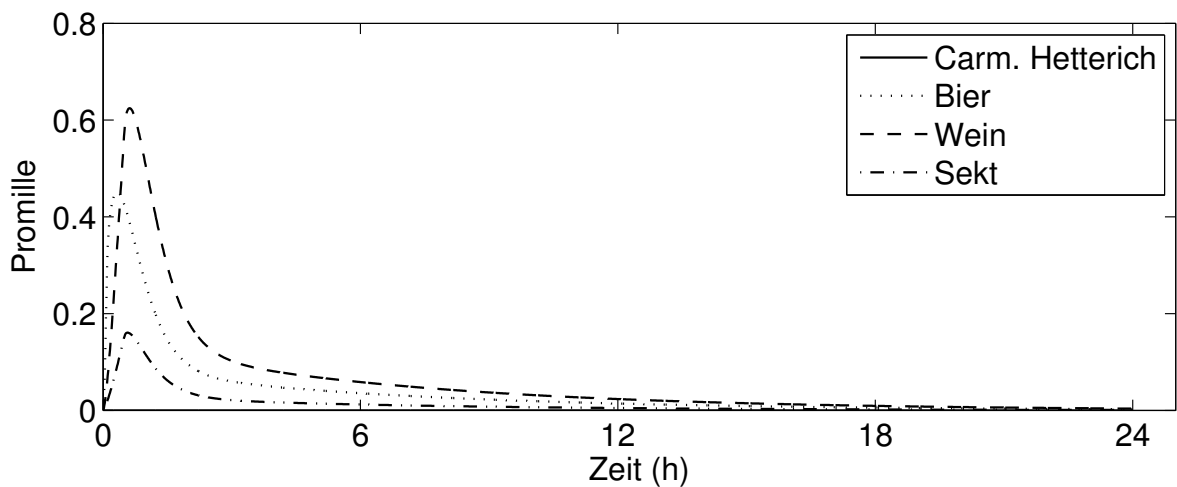
(b) Blut Neugeborenes



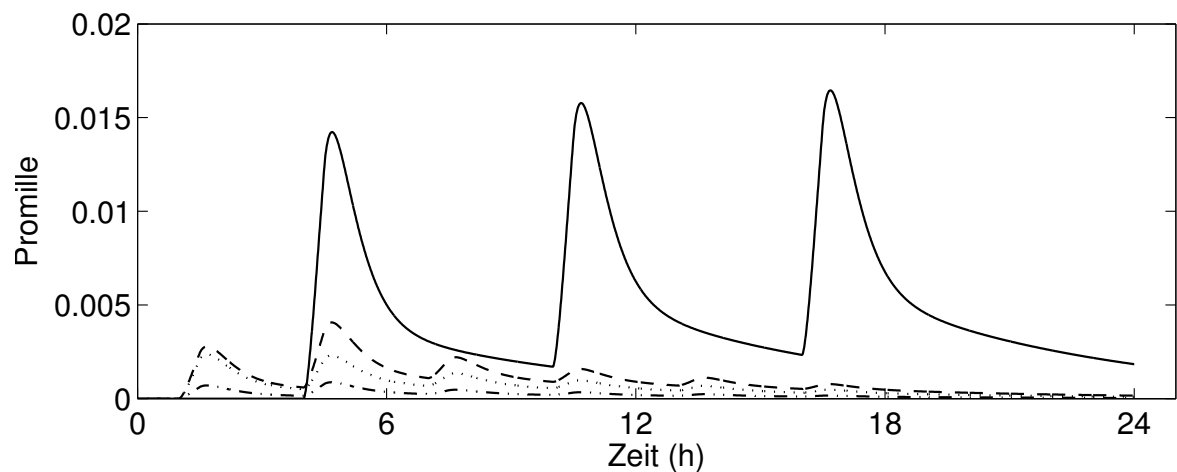
(c) Gehirn Neugeborenes

Abbildung 4.3.: Alkoholkonzentration (‰) nach Trinken der stillenden Mutter von 0,25 l Wein, 0,5 l Bier, 0,1 l Sekt: (a) im Blut der Mutter, (b) im Blut des gestillten Neugeborenen, unmittelbar nach Trinken der Mutter (Stillabstand alle 2 h), (c) im Gehirn des gestillten Neugeborenen, unmittelbar nach Trinken der Mutter (Stillabstand alle 2 h). (b) und (c) zum Vergleich: Alkoholkonzentration in Blut und Gehirn des Säuglings nach Behandlung mit Carminativum Hetterich®.

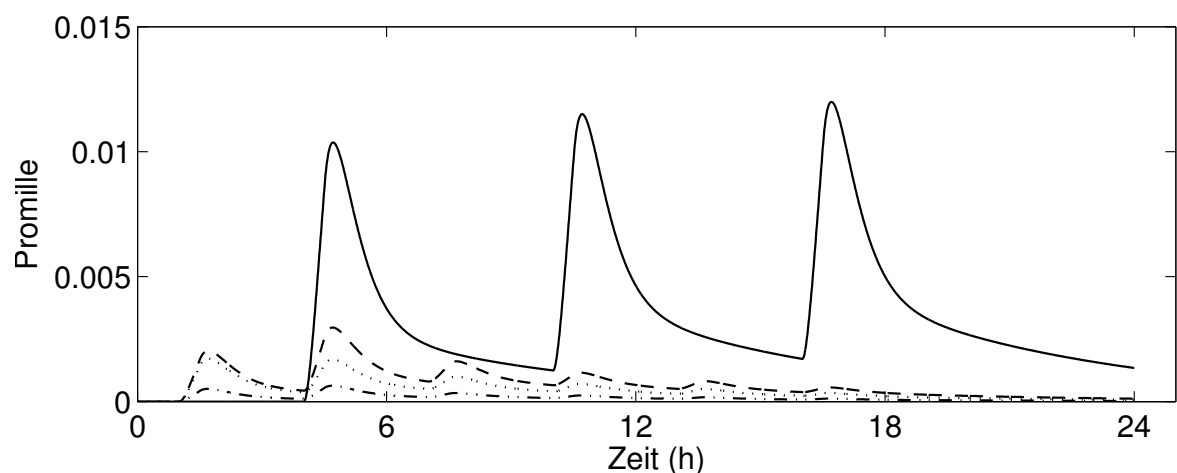
4. Kinetik



(a) Blut stillende Mutter



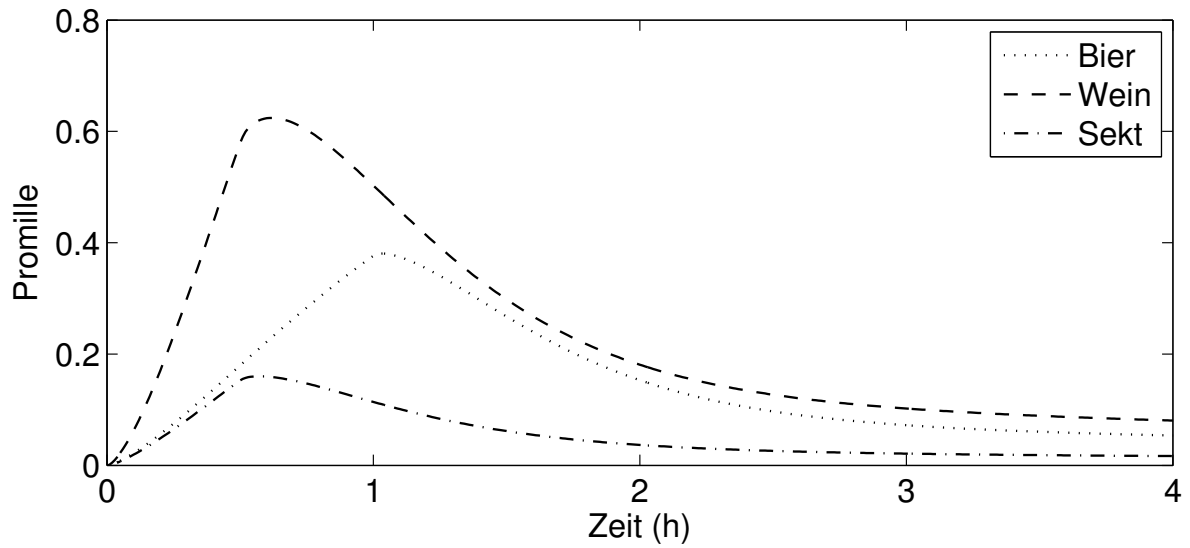
(b) Blut Säugling (3 Monate)



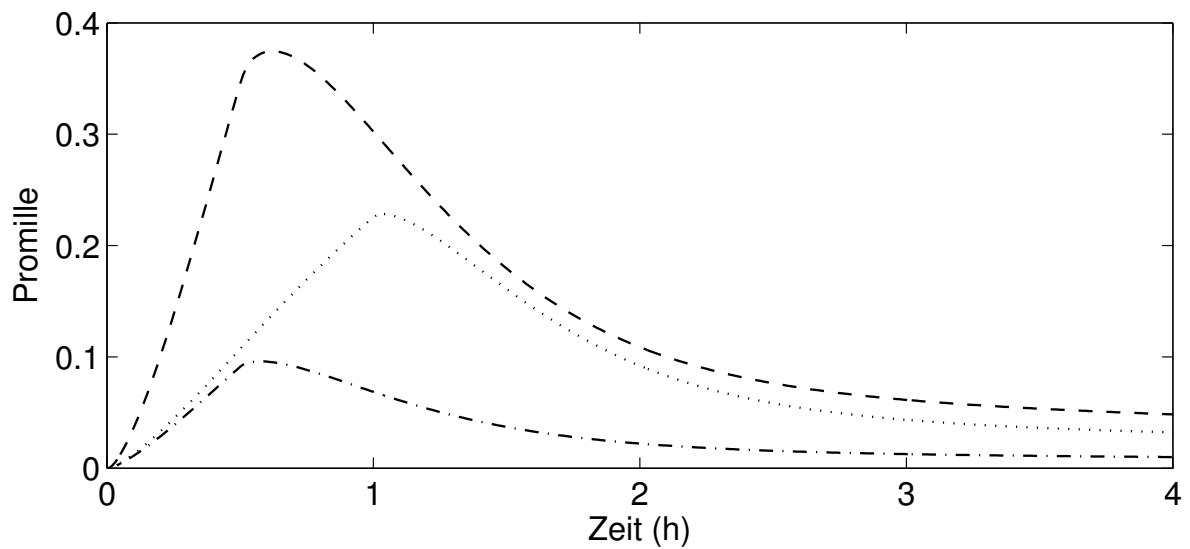
(c) Gehirn Säugling (3 Monate)

Abbildung 4.4.: Alkoholkonzentration (‰) nach Trinken der stillenden Mutter von 0,25 l Wein, 0,5 l Bier, 0,1 l Sekt: (a) im Blut der Mutter, (b) im Blut des gestillten Säuglings (3 Monate), unmittelbar nach Trinken der Mutter (Stillabstand alle 3 h), (c) im Gehirn des gestillten Säuglings (3 Monate), unmittelbar nach Trinken der Mutter (Stillabstand alle 2 h). (b) und (c) zum Vergleich: Alkoholkonzentration in Blut und Gehirn des Säuglings nach Behandlung mit Carminativum Hetterich®.

4. Kinetik



(a) Blut schwangere Mutter



(b) Blut Fetus

Abbildung 4.5.: (a) Alkoholkonzentration (‰) im Blut der Schwangeren nach 0,25 l Wein, 0,5 l Bier und 0,1 l Sekt. Alkoholkonzentration (‰) im Blut des Fetus nach Trinken der Mutter. Jeweils über einen Zeitraum von vier Stunden.

4. Kinetik

Tabelle 4.5.: Spitzenkonzentrationen (‰) im Blut der stillenden bzw. schwangeren Mutter, des Neugeborenen und des 3 Monate alten Säuglings, sowie im Uterus/Feten der Schwangeren, nach Aufnahme diverser Getränke unterschiedlichen Alkoholgehalts. Zum Vergleich die erreichten Konzentrationen nach Gabe des alkoholhaltigen Arzneimittels Carminativum Hetterich® an die Säuglinge. Zusätzlich ist die Gesamtaufnahmemenge an Alkohol angegeben.

	Spitzenkonzentration (‰)				Gesamtaufnahme Alkohol (mg)		
	Neugeborenes	3 Monate Säugling	Stillende/schwangere Mutter	Uterus/Fetus	Neugeborenes	3 Monate Säugling	Stillende/schwangere Mutter
0,00 ‰-Bier (0,5l)	*	*	0,00005	*	0,04	0,08	100
Saft (0,5l)	*	*	0,0002	*	0,18	0,32	400
Alkoholfreies Bier (0,5l)	0,0002	0,00014	0,0135	0,009	1,2	2,1	2500
Sekt (0,1l)	0,0008	0,0008	0,15	0,09	6,8	12,0	11000
Bier (0,5l)	0,0023	0,0028	0,36	0,23	19,8	35,7	25000
Wein (0,25l)	0,0034	0,0039	0,59	0,35	30,5	55,0	32500
Carminativum Hetterich®	0,0141	0,0141	—	—	138,0	276,0	—

* Konzentration < 0,00015 ‰

4.2.3. Diskussion

Der Konzentrations-Zeit-Verlauf im Blut und im Gehirn gestillter Kinder (Neugeborenes und drei Monate alter Säugling) wurde nach Aufnahme verschiedener Getränke unterschiedlicher Alkoholkonzentrationen durch die Mutter über unterschiedliche Zeiträume unter realitätsnahen Bedingungen simuliert. Wie die Ergebnisse zeigen, entstehen im Blut der Mutter nach Aufnahme der Alkoholmenge, die in 0,25 l Wein enthalten ist, Alkoholkonzentrationen von bis zu 0,6 ‰, sofern der Wein innerhalb von 30 Minuten aufgenommen wird. Mit diesem Wert liegt man bereits oberhalb der Grenze, bei der im Straßenverkehr eine Ordnungswidrigkeit begangen würde.

Die simulierten Maximalkonzentrationen liegen in Bereichen, wie sie bei Experimenten mit Messungen von Blutkonzentrationen bestimmt wurden [100, 102]. Angesichts der Variationen des Verteilungsvolumens und der Abbauraten, deren oberster Wert um den Faktor 2 über dem untersten Wert liegt (siehe [100]), ist die Übereinstimmung der simulierten Konzentrationskurve mit den gemessenen Werten in einem akzeptablen Bereich [102].

Motivation dieser Studie war die Frage, welche Alkoholkonzentrationen in einem gestillten Säugling zu erwarten sind. Da es ethisch nicht vertretbar ist, Experimente an Säuglingen vorzunehmen, bei denen die Körperflüssigkeiten auf Alkoholkonzentrationen untersucht werden, wurde hier auf ein physiologisch basiertes kinetisches Modell ausgewichen. Diese Methode erlaubt es, diese Fragestellung ohne den Einsatz invasiver Techniken zu bearbeiten, auch unter Annahme verschiedener Parameter, wie altersbedingte Unterschiede in Organ- und Körpergewichten, Organdurchblutungen und insbesondere die altersabhängige Expression des quantitativ wichtigsten alkoholmetabolisierenden Enzyms, der Alkoholdehydrogenase. Das physiologische Modell ist also in der Lage, pathologisch-anatomische wie auch physiologische Besonderheiten des Menschen in unterschiedlichen Lebensaltern zu berücksichtigen.

Bei der Simulation der Alkoholkonzentrationen in den gestillten Säuglingen ergaben sich deutlich geringere Blutalkoholkonzentrationen als in der Mutter. Die Werte variierten in Abhängigkeit vom gewählten Szenario und der Alkoholmenge, die die Mutter über die Getränke aufnahm. Die Werte lagen durchgängig in allen gewählten Szenarien unterhalb von Konzentrationen von 0,05 ‰ Alkohol (108 μM) im Blut. Bei identischer Aufnahme an alkoholischen Getränken bei der schwangeren Mutter wurden *in utero* Konzentrationen erreicht, die um zwei Größenordnungen höher lagen als die Konzentrationen, die im gestillten Säugling simuliert wurden. Aufgrund dieser Unterschiede können Wirkungen auf das Zentralnervensystem, die bei Alkoholexposition während der Schwangerschaft tierexperimentell und klinisch beobachtet wurden, nicht auf die Situation beim Stillen übertragen werden.

4. Kinetik

Zur Validierung der Ergebnisse wurden die simulierten Konzentrations-Zeit-Profile der Mütter mit publizierten experimentellen Daten verglichen [100, 102]. Es zeigten sich gute Übereinstimmungen, die Abweichungen lagen bei unter 20 %.

Die Fragestellung der biologischen Wirkungen auf die neuronale Entwicklung der durch Stillen nach mäßigem Alkoholkonsum entstehenden Konzentrationen wurde auch tierexperimentell und *in vitro* behandelt. Gemäß dieser Studien sind *In-vivo*-Dosen von mehreren Gramm [103] oder Konzentrationen im Bereich mehrerer Promille [104] erforderlich, um entsprechende Effekte auszulösen. Bei tierexperimentellen Studien in Mäusen waren Dosen von 2,5 g/kg bw/d über einen Zeitraum von mehreren Wochen erforderlich, um neurodegenerative Effekte hervorzurufen [105]. Diese Dosis liegt mehr als 100-fach über der Dosis, die durch das Stillen übertragen wird.

Bei *In-vitro*-Tests wurden neuronale Zellkulturen mit Alkohol behandelt. Bei Konzentrationen von 50-100 mM (2,2 - 4,2‰) trat vermehrt Zelltod in Form von Apoptose auf [106]. In einem elektrophysiologischen Modell konnten hingegen bei Konzentrationen von 100 mM keine Wirkungen gezeigt werden [107].

Bei Versuchen mit gestillten Jungtieren konnten eine verringerte Gewichtszunahme sowie Veränderungen in der Zusammensetzung der Milch festgestellt werden. Allerdings traten diese Effekte erst bei täglichen Dosen von 12,8 bis 14,9 g/kg bw/d über einen Zeitraum von 14 Tagen auf [108]. Die Dosis von 0,25 l Wein liegt mit 0,46 g/kg bw/d um den Faktor 30 niedriger.

Bei Humanstudien wurden Veränderungen bei der grobmotorischen Entwicklung von gestillten Kindern im ersten Lebensjahr beschrieben, deren Mütter geringe Mengen Alkohol (etwa 24 g/Tag) aufgenommen hatten [109]. Bei einer zweiten Studie mit 915 Kindern im Alter von 18 Monaten konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden [110].

Den Untersuchungen steht die Tatsache gegenüber, dass ein alkoholhaltiges pflanzliches Arzneimittel zur Behandlung von Blähungen im Säuglingsalter ohne Zeitbegrenzung in der Anwendung zugelassen ist und bei ordnungsgemäßer Anwendung höhere Alkoholmengen dem Säugling zuführt, als dies beim Stillen nach mütterlicher Aufnahme von 0,25 l Wein der Fall wäre. In der Schweiz ist ein Arzneimittel verfügbar, das Vitamin D3 enthält und als 65 % alkoholische Lösung zugelassen ist. Für beide Arzneimittel sind amtliche Risikoabschätzungen vorgenommen worden. In diesen konnten keine Hinweise gefunden werden, dass Säuglinge gesundheitlich zu Schaden kommen würden, auch wenn sie über einen längeren Zeitraum mit den Arzneimitteln behandelt würden.

Aufgrund der Ergebnisse des Modells sowie den Berichten von Effekten in vorhandenen Studien, scheint es zulässig, die französische Empfehlung („gelegentlich 1 bis 2

Gläser Wein“ [81]) und die kanadische Empfehlung („kein exzessives oder tägliches Alkoholtrinken, gelegentlicher Konsum ohne schädigende Wirkung auf das Kind“ [82]) als übereinstimmend mit wissenschaftlichen Daten zu sehen, während stärkere Einschränkungen nicht wissenschaftlich basiert sind.

4.3. Polymorphismen Bisphenol-A-metabolisierender Enzyme

4.3.1. Einleitung

Bisphenol A (BPA) ist eine Chemikalie mit weit verbreiteter Anwendung, was hohe Produktionsvolumina bedingt. Innerhalb der Europäischen Union (EU) wird BPA mit einem jährlichen Produktionsvolumen von über 1 Million Tonnen hergestellt, weltweit zählt der Stoff zu den Chemikalien mit den größten Produktionsvolumina. In der Kunststoffindustrie wird er schon seit den 40er und 50er Jahren des 20. Jahrhunderts eingesetzt [111]. Der Stoff hat die Summenformel $C_{15}H_{16}O_2$, was ein Molekulargewicht von 228 g/mol mit sich bringt und ist unter der CAS-Nummer 80-05-7 registriert. Er hat einen LogP von 3,32 und eine relativ geringe Wasserlöslichkeit von 300 mg/L [112]. Die Chemikalie ist weit verbreitet bei der Kunststoffproduktion. Sie wird unter anderem verwendet bei der Herstellung von Epoxidharzen und Polycarbonaten [113, 114]. Darüber hinaus wird Bisphenol A bei der Herstellung von Phenolharzen und Polyacrylaten verarbeitet und befindet sich als Beschichtung innerhalb von Konservendosen [115]. Auch in Wasserflaschen, Sportausrüstung und Elektronikgeräten ist der Stoff vorhanden, wodurch eine Exposition unvermeidlich ist [116]. Gemäß Europäischer Gesetzgebung werden für sämtliche Plastikerzeugnisse sogenannte *migration limits* erhoben, also Grenzwerte für Mengen, die aus den Produkten in Lebensmittel übergehen dürfen. Für BPA liegt das *specific migration limit* (SML) seit 2004 bei 0,6 mg/kg Nahrung. Eine Ausnahme bilden Flaschen für Säuglinge, für die innerhalb der EU seit 2011 jeglicher BPA-Gehalt untersagt ist [117]. Die Chemikalie Bisphenol A ist für ihre endokrine Wirkung bekannt, ähnlich polychlorierten Dioxinen, Alkylphenolen, Phthalaten und einigen Pestiziden [118]. Die Eigenschaften des BPA als „endokriner Disruptor“ wurden teilweise *in vivo* und überwiegend *in vitro* nachgewiesen. Daher ist der Stoff von hohem wissenschaftlichem Interesse [119, 111]. Die Wirkungen beziehen sich auf östrogene Effekte, verringerte Spermienproduktion, erhöhte Prolaktinausschüttung¹, und auf erhöhte Zellproliferation in einer Brustkrebs-Zelllinie [115]. Auch steht BPA im Verdacht, die embryonale und fetale Entwicklung zu beeinträchtigen [120].

¹Ein Hormon, das in höheren Mengen während der Schwangerschaft gebildet wird

Die Testergebnisse führten zu kontroversen Diskussionen, wie diese zu interpretieren seien und ob der 2006 von der EFSA festgelegte TDI von 0,05 mg/kg bw/d korrigiert werden müsse. Nach einer Neubewertung der EFSA im Jahr 2011 wurde allerdings entschieden, dass es nicht notwendig sei, den vormals festgelegten TDI zu verringern [117, 121, 122, 123]. Für Menschen gibt es verschiedene Expositionswege; Exposition durch Nahrungsmittel und Getränke gilt als hauptsächliche orale Expositionsquelle, insbesondere bei Nahrungsmitteln aus Konservendosen und nach Kontakt zu Polycarbonaten [119]. Beim Biomonitoring von Urin konnten in Studien Werte bis 1 µg/kg/Tag aus über 4000 Proben ermittelt werden [124]. Über BPA-haltiges Papier ist auch eine dermale Exposition von BPA möglich [125]. In einem vorherigen pharmakokinetischen Modell wurde die Konzentration von BPA im Blut über dermale und orale Exposition untersucht. Hierbei konnten deutlich niedrigere Werte im unteren Nanogramm-Bereich ermittelt werden [88, 89]. Die Ergebnisse der Simulationen deckten sich gut mit experimentellen humanen Daten, die von Völkel et al. [126] und Teeguarden et al. [127] ermittelt wurden. Diese Autoren konnten kein BPA im Blut der Probanden nachweisen. Auch bei einem Modell, das von Tierdaten auf den Menschen extrapolieren kann, wurden die zuvor simulierten Werte bestätigt. In diesem Modell wurden tierexperimentell ermittelte Werte von Ratten und Affen erhoben und auf den Menschen übertragen [128]. Diese experimentellen Ergebnisse waren auch im Einklang mit den Resultaten eines physiologisch basierten toxikokinetischen Modells von Edginton und Ritter [129].

Demgegenüber stehen jedoch zahlreiche experimentelle Studien, die abweichende Blutwerte ermitteln konnten. Diese gemessenen Werte wichen zehnfach [130, 115, 131, 120] bis mehrere hundertfach [132] von den simulierten Werten ab. In einer Studie von Vandentorren et al. [116] wurden Proben von 250 französischen schwangeren Frauen auf ihre Gehalte an BPA und Phthalaten untersucht. Da BPA nach Aufnahme in den Körper schnell renal eliminiert wird, ist eine Akkumulation nur beschränkt möglich. Die Autoren erkannten, dass die Proben erhöhte Werte aufwiesen; so hoch, dass eine Exposition unmittelbar vor der Blutabnahme hätte erfolgen müssen. Als Fehlerquelle konnte eine nachträgliche Verunreinigung ermittelt werden. Da in medizinischen Instrumenten u. a. zur Blutabnahme Bisphenol A und Phthalate enthalten sind, konnten diese die nachträgliche Verunreinigung verursachen.

Auch in einer Studie von Markham et al. [133] konnte ermittelt werden, dass BPA aus Geräten der Probenentnahme und Probenlagerung wie Plastikschräuchen als Verunreinigung in die Proben gelangen und die Ergebnisse dadurch verfälschen kann. In einer Studie von 2014 wurden diverse Venenverweilkanülen (Butterfly-Kanülen) samt Blutentnahmeröhrchen (Vacutainer®) auf ihr Kontaminationspotential durch BPA untersucht. Während in einigen Proben Kontaminationen von über 25 ng/ml ermittelt

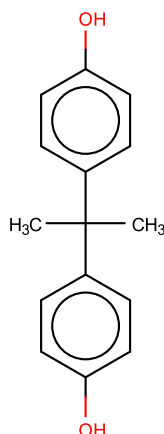


Abbildung 4.6.: Molekülstruktur von Bisphenol A (BPA).

werden konnten, waren Proben, die durch kunststofffreie Nadeln gewonnen wurden, nicht belastet [134]. Diese Kontaminationen könnten die deutlich erhöhten Werte einiger Studien erklären.

Im Menschen wird BPA oral sehr gut absorbiert und unterliegt einem hohen First-pass-Metabolismus. Nahezu 90 % werden hier nach oraler Aufnahme in der Leber metabolisiert [135]. In Untersuchungen an freiwilligen Probanden konnten bei Männern 97 % des oral aufgenommenen BPA im Urin nachgewiesen werden und 84 % im Urin von Frauen [126, 136]. Um Verunreinigungen auszuschließen und sichere Aussagen treffen zu können, wurde das oral verabreichte BPA zuvor deuteriert [137].

In der Leber unterliegt BPA gleich dem Phase-II-Metabolismus, da es aufgrund seiner Struktur keines Phase-I-Metabolismus' bedarf. Die entstehenden Metabolite werden anschließend renal eliminiert. Der Stoff konjugiert überwiegend an Glucuronsäure. Für die Glucuronidierung sind mehrere Enzyme verantwortlich. In erster Linie ist dies die UDP-Glucuronyltransferase 2B15 (UGT2B15). Aber auch andere UDP-Glucuronyltransferasen sind an der Konjugation beteiligt, allerdings zu deutlich geringeren Anteilen: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7 [118]. Eine Darstellung findet sich in Abb. 4.7.

Zu einem gewissen Teil wird BPA auch sulfatiert. Die entsprechenden Isoenzyme wurden bislang noch nicht identifiziert, in Anbetracht der strukturellen Eigenschaften des Moleküls ist es jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit die Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) [119].

Das Isoenzym UGT2B15 wird im Menschen polymorph exprimiert. Es gibt Hinweise, dass genetische Mutationen funktionelle Effekte verursachen können, insbesondere wenn diese in einem der sechs UGT2B15-Allele (UGT2B15.2) auftreten. In Studien

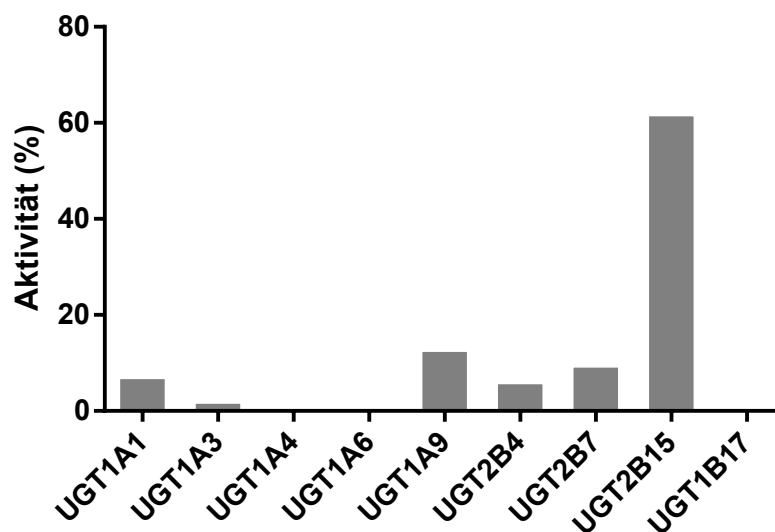


Abbildung 4.7.: BPA-Glucuronidierungsaktivität rekombinanter humaner UGTs. Mit über 60 % hat Isoenzym UGT2B15 den größten Anteil am BPA-Metabolismus. Nach [118].

konnte dieser funktionelle Effekt beispielhaft erläutert werden: Der Metabolismus der zwei Benzodiazepine Lorazepam und Oxazepam war reduziert, wenn die funktionelle Variante von UGT2B15.2 exprimiert wurde. Diese Ergebnisse konnten *in vitro* in entsprechend exprimierenden Hepatozyten und *in vivo* bei Patienten nachgewiesen werden, bei denen dieser Genotyp bekannt war [138, 139, 140, 141].

In einer Studie von 2011 untersuchten Hanioka et al. [142] *in vitro* den Metabolismus von BPA, indem humane UGT2B15-Enzyme in Insektenzellen exprimiert wurden. Untersucht wurden der Wildtyp UGT2B15.1 und sämtliche bekannte Varianten: UGT2B15.2, UGT2B15.3, UGT2B15.4, UGT2B15.5, UGT2B15.6, UGT2B15.7. Im Ergebnis konnten keinerlei Unterschiede bei der Michaeliskonstante K_m zwischen den verschiedenen Varianten und dem Wildtyp-Enzym gefunden werden. Lediglich bei einem Vergleich der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} konnten bei UGT2B15.2 und UGT2B15.5 deutlich niedrigere Werte gegenüber dem Wildtypen beziffert werden. Dies hatte eine erheblich reduzierte intrinsische Clearance ($Cl_{int} = V_{max}/K_m$) von 10,2 % respektive 3,9 % im Vergleich zum Wildtypen zur Folge. Ein Individuum, das eines der Allele UGT2B15.2 oder UGT2B15.5 ausprägt, verfügt dementsprechend über einen verringerten Metabolismus, was die systemisch verfügbare Dosis an BPA durch eingeschränkten First-Pass-Metabolismus erhöht. Dies führt entsprechend zu höheren Blutkonzentrationen an toxikologisch aktivem unkonjugierten Bisphenol A.

Kuester und Sipes [143] untersuchten die intrinsische Clearance (Cl_{int}) von BPA *in vitro* an Hepatozyten von 15 humanen Spendern (8 männlichen, 7 weiblichen). Die

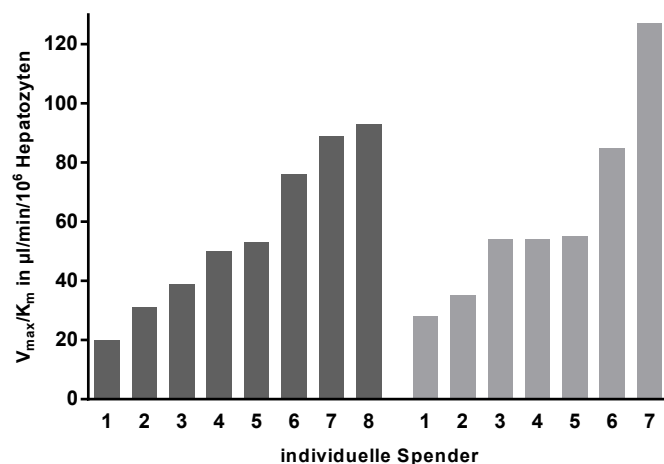


Abbildung 4.8.: Intrinsische BPA-Clearance (Cl_{int}) in Hepatozyten von 15 verschiedenen Spendern (8 männliche ■, 7 weibliche ▒), in aufsteigender Reihenfolge. Nach [143].

Clearance der Spender ist in Abb. 4.8 aus den Tabellen 3 und 4 der Originalpublikation zusammengestellt. Die Spender wurden in drei gleich große Gruppen aufgeteilt, in Abhängigkeit der Cl_{int} . Anschließend wurde untersucht, welche Varianten von UGT2B15 verantwortlich für einen erhöhten Blutspiegel an unkonjugiertem BPA waren und in welchem Ausmaß die reduzierte metabolische Aktivität zur Erhöhung der Muttersubstanz BPA beitrug.

Das Ziel war, eine Erklärung für die Unterschiede in den BPA-Gehalten im Blut zu finden, die aktuell publiziert sind. Diese reichen von sehr hohen Werten bis unterhalb der Detektionsgrenze und können nicht durch die Dosierung oder das untere Limit der Detektion der Analyse erklärt werden.

Daher wurde eine physiologisch basierte pharmako-/toxikokinetische (PBPK) Modellierung durchgeführt, bei der die verschiedenen K_m - und V_{max} -Werte aus der Publikation von Kuester und Sipes [143] verwendet wurden. Darüber hinaus wurden *in vitro* ermittelte K_m - und V_{max} -Werte der rekombinanten humanen UGT2B15-Enzyme von Hanioka et al. [142] zur Modellierung herangezogen.

4.3.2. Methoden

Das eingesetzte physiologisch basierte Modell wurde schon zuvor bei der Simulation der Plasma-Konzentrationen von BPA nach oraler Gabe eingesetzt [88, 89] und in einer Abwandlung bei der Modellierung des Alkoholgehalts in Frauenmilch in dieser Arbeit (Abschnitt 4.2).

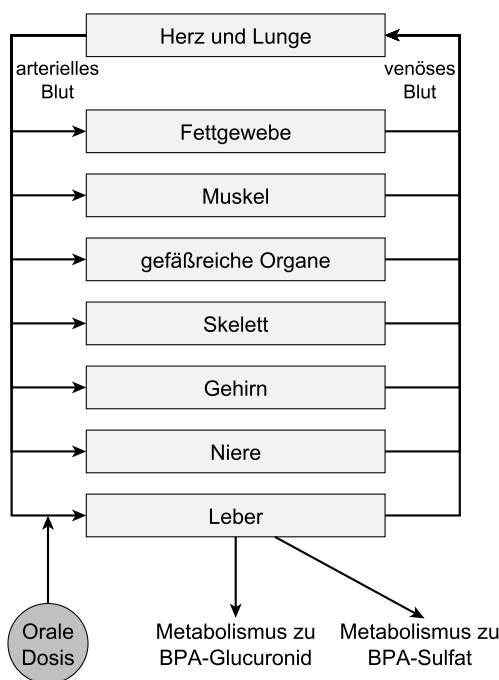


Abbildung 4.9.: Modell von BPA-Verteilung und Metabolismus nach oraler Applikation. Metabolismus geschieht in Phase II mittels Glucuronidierung und Sulfatierung.

In diesem Modell wurde die Exkretion des BPA zu glucuronsäure- und sulfatkonjugierten Metaboliten simuliert (Abb. 4.9). Für den Metabolismus via Glucuronidierung wurden die Parameter K_m und V_{max} der 15 verschiedenen Hepatozyten-Spender von Kuester und Sipes [143] verwendet. Bei einem weiteren Durchlauf wurden die *In-vitro*-Daten von Hanioka et al. [142] eingesetzt. Für den Phase-II-Metabolismus über die Sulfatierung wurden 7,4% der Glucuronidierung angenommen, was *in vitro* ermittelten Daten zum BPA-Metabolismus in humanen Leberzellen entspricht [144].

Die orale Absorption wurde mit einem Wert von 90% angesetzt. Dies entspricht Daten von Völkel et al. [126, 136]. Der intestinale First-Pass-Effekt von Bisphenol A ist zu vernachlässigen. Da er nur 1,2% des hepatischen First-Pass-Effektes beträgt, wurde dieser Weg nicht im Modell implementiert [145].

Die Halbwertszeit bei oraler Absorption wurde mit 15 Minuten eingeschätzt, da maximale Konzentrationen radioaktiv markierten BPAs im Urin etwa eine Stunde nach Gabe gemessen werden können [146] und maximale Konzentrationen des Metaboliten BPA-Glucuronid etwa 80 Minuten nach oraler Verabreichung von 5 mg d16-Bisphenol A (deuteriertem BPA) gemessen werden können [126].

Physiologische Daten der Organ-Volumina und Daten zum Blutfluss wurden von offiziellen Quellen wie bei Abraham et al. [87] entnommen. Die Aufteilung von Gewebe

4. Kinetik

zu Blut wurde nach Schmitt [95] vorgenommen. Die verwendeten und berechneten Parameter für die Modellierung sind in Tabelle 4.6 aufgelistet.

Die Blutkonzentrationen wurden nach einer täglichen oralen Dosis von 1 µg/kg bw/d modelliert. Die tägliche Dosis wurde in drei gleich große Einzeldosen aufgeteilt, um drei Mahlzeiten täglich zu simulieren. Die veranschlagte Dosis deckt das *worst-case*-Szenario für eine Exposition gegenüber BPA ab. Sie entspricht den höchsten individuellen Dosen, die in Biomonitoring-Studien an Urin weltweit nachgewiesen werden konnten [124, 147, 117]. Die durchschnittlichen Expositionswerte der Studien lagen hingegen deutlich darunter im zweistelligen Nanogramm-Bereich. Bei entsprechenden Studien innerhalb der USA und Europa wurden Mittelwerte von 0,05 µg/kg bw/d als realistische Exposition eingeschätzt [117].

Im Modell wurden Spitzenwerte (C_{max}) und die Flächen unter der Kurve (*Area under the curve* - AUC) ermittelt. Die Gleichungen wurden mit der Software Matlab® gelöst.

Tabelle 4.6.: Für das Modell verwendete Parameter.

Organ	Herzzeitvolumen 390 l/h [87] Blutfluss (l/h) [87]	Körpergewicht 73 kg [87] Volume (l) [87]	Partitionskoeffizient* Organ/Blut
Fett	19,5	18,2	3,31
Leber	99,5	1,8	1,46
Gehirn	46,8	1,45	1,06
Niere	74,1	0,31	1,35
Muskeln	65,8	0,4·bw	1,35
Haut	20,0	0,0371·bw	5,7
Gefäßreiches Gewebe	56,5	3,768	1,43
Knochen	7,8	9,33	0,5

* Berechnet nach Schmitt [95] mit einem logP von 3,4 [113], Wasserlöslichkeit von 300 mg/l [113] und einer Proteinbindung von 6 % [148]

4.3.3. Ergebnisse

4.3.3.1. Blutkonzentrationen unter Berücksichtigung der K_m - und V_{max} -Werte der 15 humanen Lebern

Bei einer oralen Exposition von 1 µg/kg bw/d ergaben sich berechnete maximale Blutkonzentrationen zwischen 7,8 und 36,9 pg/ml und AUCs zwischen 29,9 und 139,4 pg/ml·h (Tabelle 4.7, Abbildung 4.10). Bei der realistischeren Dosis von 0,05 µg/kg bw/d wurden maximale Blutkonzentrationen von 0,39 bis 1,85 pg/ml erreicht, mit

4. Kinetik

Tabelle 4.7.: Simulierte C_{\max} (ng/ml) und AUC (ng/ml·h) im Blut der individuellen Spender der humanen Hepatocyten in Abhängigkeit ihrer individuellen V_{\max} - und K_m -Werte nach [143]. Orale Dosis: 1 µg/kg bw/d

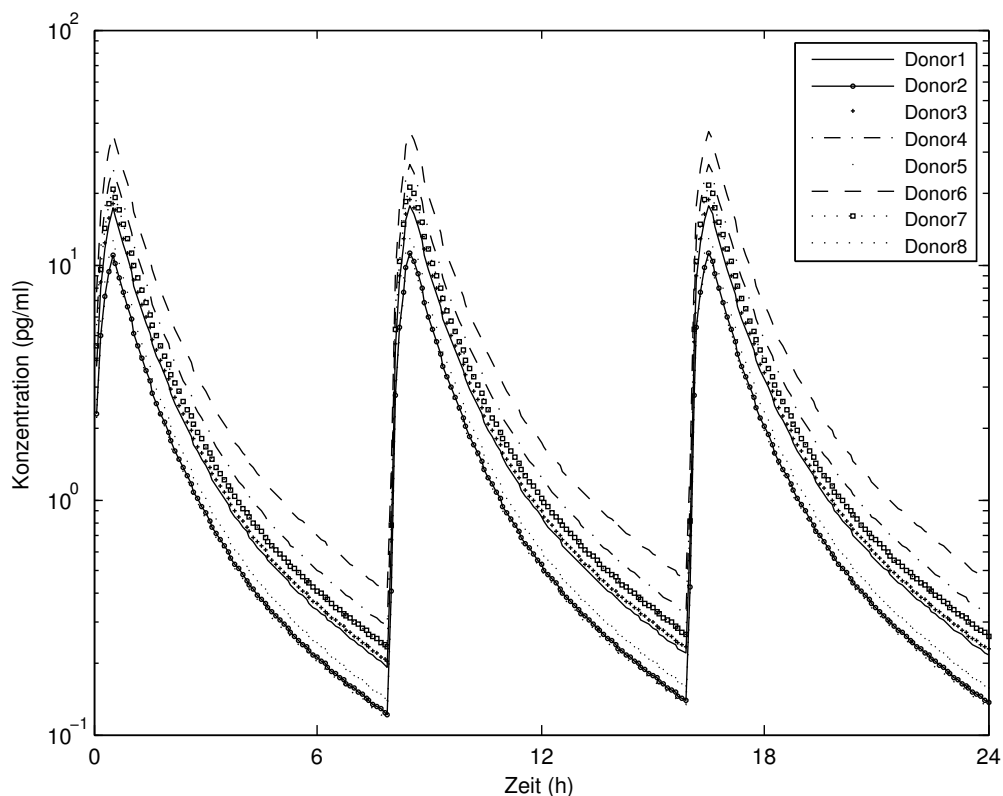
Donor Nr.	V_{\max} (nmol/min g/Leber)	K_m (µM)	V_{\max}/K_m (ml/min g/Leber)	C_{\max} (pg/ml)	AUC (pg/ml·h)
männlich					
1	47,7	8	5,6	17,8	67,4
2	60,1	6	10,2	11,2	42,2
3	33,7	6	5,6	18,8	71,1
4	45,0	12	3,7	26,4	99,8
5	68,7	8	8,6	12,9	48,6
6	31,7	13	2,4	36,9	139,4
7	57,4	12	4,8	21,6	81,5
8	73,5	7	10,5	10,7	40,5
weiblich					
1	60,9	9	6,8	15,2	58,9
2	27,9	8	3,5	25,5	101,5
3	100,2	7	14,3	7,8	29,9
4	47,3	11	4,3	21,8	86,2
5	66,8	7	9,5	11,3	43,4
6	67,0	10	6,7	15,3	59,4
7	31,0	5	6,2	16,3	63,4

AUCs zwischen 1,5 und 6,9 pg/ml·h. Die intrinsische Clearance ($Cl_{\text{int}} = V_{\max}/K_m$) schwankte zwischen 2,4 und 14,3 ml/min g/Leber, was 6-fache Unterschiede widerspiegelt.

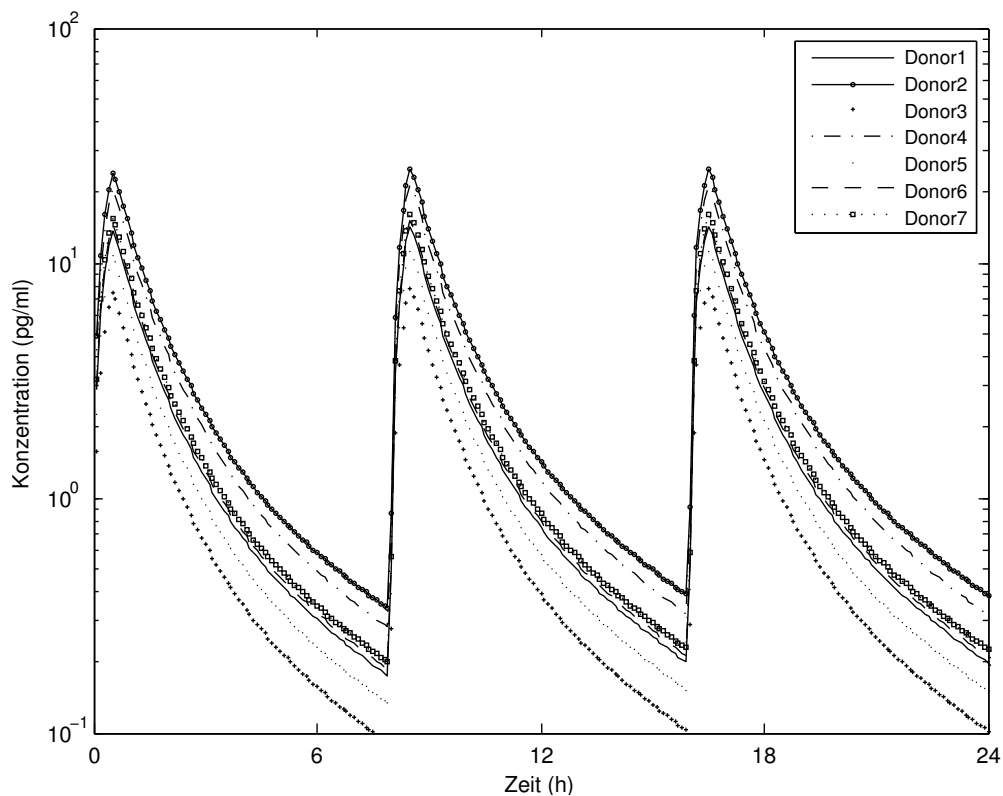
4.3.3.2. Blutkonzentrationen unter Berücksichtigung der K_m - und V_{\max} -Werte aus *In-vitro*-Studien: Wildtyp gegenüber UGT2B15.2 und UGT2B15.5

Für die Mutanten UGT2B15.2 und UGT2B15.5 stehen individuelle Cl_{int} -Werte der BPA-Glucuronidierung von 10,2 und 3,9% der Kapazität des Wildtyps zur Verfügung, was einer Reduzierung um den Faktor 9,8 respektive 25,6 entspricht. Bei der gegebenen oralen Dosis von 1 µg/kg bw/d ergaben sich laut Modell C_{\max} -Werte, die um den Faktor 3,9 und 4,9 höher waren als mit den Enzymen des Wildtyps. Die Flächen unter den Kurven (AUC) waren 4,9 und 5,5 mal so groß wie die des Wildtyps (Tabelle 4.8, Abb. 4.11).

4. Kinetik



(a) BPA-Konzentration Männer



(b) BPA-Konzentration Frauen

Abbildung 4.10.: BPA-Konzentrations-Zeitprofil im Blut von 8 männlichen und 7 weiblichen Probanden mit den metabolischen Konstanten der individuellen Spender, wie von Kuester and Sipes [143] ermittelt.

Tabelle 4.8.: Simulierte C_{\max} (ng/ml) und AUC (ng/ml·h) im Blut nach einer oralen Dosis von 1 $\mu\text{g/kg}$ bw/d mit V_{\max} - und K_m -Werten rekombinanter UGT2B15-Enzyme, die in Insektenzellen exprimiert wurden [142].

	V_{\max} (pmol/min mg/Protein)	Prozent des Wildtyps	C_{\max} (pg/ml)	AUC (pg/ml·h)
UGT2B15.1 (Wildtyp)	650	100,0	15,4	60,5
UGT2B15.2 (Mutante)	88	10,2	57,8	255,0
UGT2B15.5 (Mutante)	28	3,9	72,0	331,0

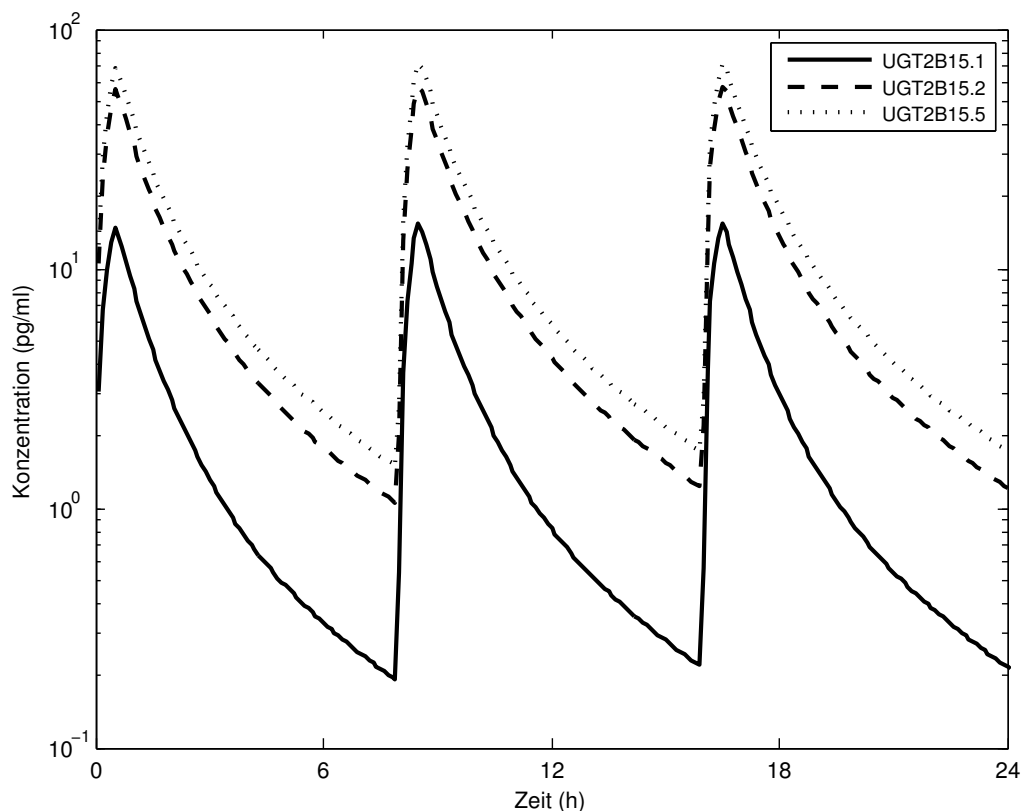


Abbildung 4.11.: Konzentrations-Zeitverlauf im Blut nach einer oralen Dosis von 1 $\mu\text{g/kg}$ bw/d mit V_{\max} - und K_m -Werten rekombinanter UGT2B15-Enzyme, die in Insektenzellen exprimiert wurden [142].

4. Kinetik

Tabelle 4.9.: Prozente der Dosen, die in Phase II über die Stoffwechselwege der Glucuronidierung und Sulfatierung metabolisiert werden.

Donor Nr.	V_{\max}/K_m (ml/min g/Leber) Glucuronidierung	Glucuronid (% der Dosis)	Sulfat (% der Dosis)
männlich			
1	5,6	87,5	12,5
2	10,2	92,2	7,8
3	5,6	86,8	13,2
4	3,7	81,5	18,5
5	8,6	90,9	9,1
6	2,4	74,1	25,9
7	4,8	84,9	15,1
8	10,5	92,5	7,5
weiblich			
1	6,8	86,7	13,3
2	3,5	77,1	22,9
3	14,3	93,3	6,7
4	4,3	80,6	19,4
5	9,5	90,2	9,8
6	6,7	86,6	13,4
7	6,2	85,7	14,3

4.3.3.3. Relative Anteile der Glucuronidierung und Sulfatierung an der BPA-Exkretion

Die Abweichungen der C_{\max} (4,7-fach) und der AUC (4,6-fach) waren geringer als die Abweichungen der intrinsischen Clearance (6-fach) in den humanen Leberzellen. Für eine Erklärung wurde der Phase-II-Metabolismus der Sulfatierung mit in das Modell einbezogen. Tabelle 4.9 enthält die Anteile der Dosen dieser Stoffwechselwege. Abbildung 4.12 zeigt, dass die beiden Stoffwechselwege in negativer Abhängigkeit zueinander stehen. Der Anteil der Dosis, der zu Sulfatkonjugaten metabolisiert wird, ist daher bei Individuen mit niedrigerer Glucuronidierungskapazität höher. Die Tatsache, dass ein größerer Anteil über den Stoffwechselweg der Sulfatierung ausgeschieden wird, erklärt, warum C_{\max} und AUC nicht im selben Ausmaß ansteigen, wie die Cl_{int} für Glucuronidierung abfällt. Trotz allem bleibt die Glucuronidierung, die durch den Polymorphismus von UGT2B15 bestimmt ist, der entscheidende Faktor für die individuelle C_{\max} und AUC, wie in Tabelle 4.7 ersichtlich wird und die Sulfatierung erbringt nicht die benötigte Kapazität, um die geringere Glucuronidierung zu kompensieren.

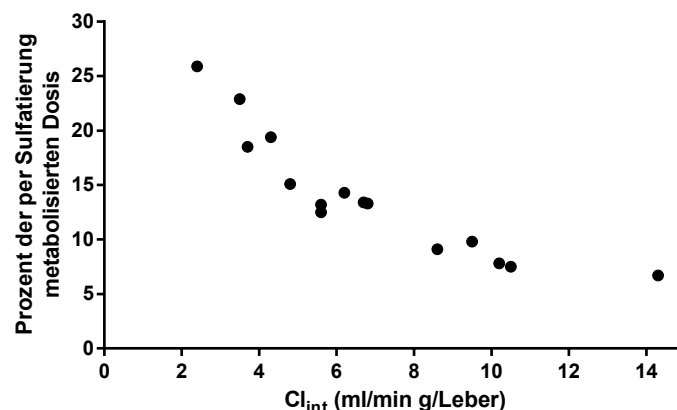


Abbildung 4.12.: Verhältnis der intrinsischen Clearance (Cl_{int}) für Glucuronidierung in humanen Hepatozyten (ml/min g/Leber) und Anteil der BPA-Dosis, die über Sulfatkonjugate ausgeschieden wird. Daten aus dem Modell.

4.3.4. Diskussion

Der Polymorphismus von UGT2B15 ist seit einigen Jahren bekannt. Mit einigen der Polymorphismen geht eine Beeinträchtigung der Glucuronidierungskapazität einher, die einen großen Teil der Bevölkerung betrifft. Diese Beeinträchtigungen wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. Meist wurden hier Benzodiazepine als Enzymsubstrate verwendet [138, 139, 140, 141]. So kam man in einer *In-vitro*-Studie zu dem Ergebnis, dass die Glucuronidierungskapazität von Oxazepam in humanen Hepatozyten bei Trägern des Allels UGT2B15.2 im Verhältnis zum Wildtypen um 40 % verringert war [138]. In dieser Arbeit wurde eine Neuanalyse der Daten von Kuester und Sipes [143] vorgenommen. Die Daten sind Ergebnisse einer *In-vitro*-Studie, in der BPA-Glucuronidierung in humanen Hepatozyten von 15 verschiedenen Spendern untersucht wurde. Diese Analyse ergab, dass der Median der unteren fünf Cl_{int} -Raten bei 36 % des Medians der oberen fünf Raten lag. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Reduzierung der Glucuronidierungskapazität, wie sie beim Oxazepam beschrieben wurde. In anderen veröffentlichten Daten von Hanioka [142] aus *In-vitro*-Untersuchungen wurden jedoch weitaus höhere Unterschiede in der intrinsischen Clearance bei der Glucuronidierung von Bisphenol A gefunden als in vorherigen Studien mit Benzodiazepinen.

Die BPA-*in-vitro*-Studie wurde an transfizierten Insektenzellen mit allen bekannten Varianten von UGT2B15 durchgeführt. Es konnte ermittelt werden, dass die intrinsische Clearance des BPA bei den Mutanten UGT2B15.2 und UGT2B15.5 nur 10,2 bzw. 3,9 % der Glucuronidierungskapazität des Wildtyps aufwies, was einer Verringerung von etwa 90 und 96 % entspricht. Diese Werte waren weitaus geringer als diejenigen, die von Kuester und Sipes [143] ermittelt wurden. Der Grund liegt möglicherweise

in unterschiedlichen *In-vitro*-Systemen, die genutzt wurden. Während Hanioka et al. transfizierte Insektenzellen nutzten, die ausschließlich UGT2B15 exprimierten, wurden bei Kuester und Sipes humane Hepatozyten verwendet, die über eine Vielzahl an metabolisierenden Enzymen verfügen. Daher ist es wahrscheinlich, dass bei Hanioka noch weitere UDP-Glucuronyltransferasen außer UGT2B15 an der Glucuronidierung des BPA beteiligt gewesen sind. So wurde in weiteren Studien an humanen hepatischen Mikrosomen ermittelt, dass neben UGT2B15 auch noch UGT2B7 an der Glucuronidierung von BPA beteiligt sein könnte [145, 118].

Die Simulation der Konzentrations-Zeit-Profile des BPA im Blut nach oralen Applikationen von 1 µg/kg bw/d und 0,05 µg/kg bw/d mit den K_m - und V_{max} -Werten von den Hepatozyten der individuellen Spender zeigt erhebliche Variabilität. Die AUCs der Individuen mit der niedrigsten und höchsten intrinsischen Clearance wichen um den Faktor 4,6 voneinander ab. Anders ausgedrückt: Bei dem Individuum mit der größten AUC betrug die intrinsische Clearance nur etwa 21 % der Leistung des Individuums mit der kleinsten AUC. Leider wurde bei den 15 Spendern keine Genotypisierung der Hepatozyten vorgenommen. Daher ist in dieser Arbeit ausgeschlossen, die intrinsische Clearance und die daraus folgende hepatische Clearance einem spezifischen Genotypen zuzuordnen. Darüber hinaus wurden bei den Studien zum *In-vitro*-Metabolismus der Benzodiazepine weder die Michaeliskonstante K_m , noch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} ermittelt, sodass auch hier ein direkter Vergleich der BPA- und Benzodiazepin-Substrate nicht möglich ist.

Daher wurde versucht, eine andere Möglichkeit zu finden, mit der die Ergebnisse der Modellierung mit Studien verglichen werden konnten, in denen die Probanden genotypisiert wurden. Bei einer Studie an gesunden Probanden wurde auch die Glucuronidierung von Oxazepam untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Glucuronidierung des Benzodiazepins verglichen mit dem Wildtypen bei heterozygoten D/Y-Genotypen um 30 % reduziert war und in homozygoten Y/Y-Genotypen sogar um 50 % [141]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Clearance von Lorazepam, einem weiteren Benzodiazepin, bei Trägern des Allels UGT2B15*2/*2 verglichen mit dem Wildtypen um 40 % beeinträchtigt war [140]. Beim Vergleich des Medians der fünf größten und der fünf kleinsten AUCs aus den Daten von Kuester und Sipes [143] fällt auf, dass die Clearance der Gruppe mit der großen AUC ebenfalls etwa 40 % der Clearance der Gruppe mit der kleinen AUC beträgt. Daher entsprechen die Ergebnisse der Simulation des BPA-Metabolismus im Menschen den *In-vivo*-Ergebnissen der Benzodiazepine, die für UGT2B15*2/*2 ermittelt wurden.

Es ist bemerkenswert, dass das Modell auf Grundlage der K_m - und V_{max} -Werte aus dem *In-vitro*-Modell mit Zellen, die ausschließlich mit UGT2B15 transfiziert wurden,

zu Ergebnissen führen, die nicht die biologische Situation widerspiegeln. Daher ist es wichtig, eine vorsichtige Auswahl der Parameter beim Erstellen eines Modells zu treffen.

Bei der C_{\max} und AUC ergaben sich zwischen den humanen Leberzellen zwischen der niedrigsten und der höchsten intrinsischen Clearance Faktoren von 4,7 respektive 4,6. Diese Werte sind in Hinblick auf eine Risikobewertung von Interesse, da sie bei dem üblichen Unsicherheitsfaktor von 100 den kinetischen Anteil des Faktors der intraspezifischen Variabilität verdeutlichen (Abb. 3.6). Der Standardwert des Faktors liegt bei 3,2. Das bringt die Unterschiede des Mittelwerts und der Extrema der Verteilung einer Population zur Geltung [64]. Der Faktor 4,6 berücksichtigt den Unterschied der beiden AUC-Extrema der Aktivität der polymorph exprimierten Enzyme. Damit scheint der Faktor von 3,2 die intraspezifische Variabilität hinreichend abzubilden, auch wenn die Ergebnisse des Modells nur auf 15 Individuen basieren.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse des PBPK-Modellings verschiedene Schlüsse zu. Die polymorph exprimierten Enzyme von UGT2B15 können starke Auswirkungen auf die systemisch verfügbare Dosis von BPA haben (C_{\max} und AUC). Darüber hinaus steigen beide Parameter in geringerem Umfang als bei *In-vitro*-Experimenten mit transfizierten Zellen, die nur UGT2B15 exprimieren, wenn beide Stoffwechselwege des BPA, Glucuronidierung und Sulfatierung, betrachtet werden. Ferner bleibt festzuhalten, dass Individuen mit genetisch eingeschränkter Kapazität von UGT2B15 höhere Blutkonzentrationen aufweisen als Individuen mit uneingeschränkter Funktionalität. Der höchste berechnete C_{\max} -Wert lag bei etwa 40 pg/ml bei einer täglichen Dosis von 1 µg/kg bw/d, der höchsten Dosis, die in Biomonitoring-Studien festgestellt werden konnte. Folglich können die hohen Blutkonzentrationen in anderen Studien nicht auf eingeschränktem BPA-Metabolismus durch genetisch beeinträchtigte UGT2B15-Aktivität beruhen. Zuletzt kann die kinetische Variabilität der Glucuronidierung von BPA als übereinstimmend mit dem Standard-Faktor von 3,2 bei der Risikoabschätzung der menschlichen Exposition gegenüber BPA angesehen werden.

5. Diskussion

Weiterführend zu den Einzeldiskussionen der verschiedenen Teilaspekte soll im folgenden Abschnitt die Arbeit zusammenfassend diskutiert werden. In der Arbeit wurden drei Beispiele für die Anwendung von *In-silico*-Toxikologie aufgezeigt:

1. QSAR
2. Interner TTC
3. Physiologisch basiertes toxikokinetisches Modelling

Die Breite des Spektrums zeigt die Vielseitigkeit dieses Ansatzes. Gemeinsam ist, dass alle drei Anwendungen Beiträge in einem quantitativen Ansatz der Risikobewertung liefern können.

Zweifellos steht die Entwicklung der *In-silico*-Toxikologie noch am Anfang. Die herkömmliche Vorgehensweise bei der Festlegung eines Grenzwertes berücksichtigt einen globalen NOEL aller Organe und Effekte, die in einem Tier aufgetreten sind, um davon unter Anwendung eines Sicherheitsfaktors einen Grenzwert abzuleiten. Besonders in Hinblick auf eine quantitative Risikobewertung im Bereich der Toxizität nach wiederholter Gabe sind daher weitere Entwicklungen unabdingbar, um Ansätze zu schaffen, die einen Organismus mit mehrfachen Targets abbilden können [149]. Diese Ansätze sind auch nötig, wenn Tierversuche in einem Bereich früher oder später ersetzt werden sollen. Darüber hinaus erfordern Modelle, die die Toxizität vorhersagen können, weitere Modelle, die die Distribution des Stoffes in die Gewebe zuverlässig simulieren können.

Ein vollständiger Ersatz der Tierversuche bei Toxizität nach wiederholter Gabe ist bis auf weiteres also nicht abzusehen. Nichtsdestotrotz können vorhandene Ansätze zum Screenen von Substanzen verwendet werden, etwa um potenzielle adverse Effekte abzuschätzen [149].

Tierversuche sind nach wie vor in vielen Bereichen unumgängliche Methoden, um Substanzen auf das von ihnen ausgehende Risiko zu untersuchen und anschließend eine Risikobewertung vorzunehmen. Der Gesetzgeber schreibt die Versuche unter anderem in der Pharmaindustrie vor, um einen möglichst hohen Sicherheitsstandard zu

gewährleisten. Auch bei der Festlegung von Grenzwerten wie ADI oder TDI sind Tierversuche noch vonnöten, werden die Werte doch vom NOEL einer vorangegangenen Tierversuchsstudie abgeleitet, indem dieser mit einem Sicherheitsfaktor von 100 belegt wird.

Dennoch wird Alternativmethoden zunehmend Bedeutung beigemessen. Dies liegt sowohl an Weiterentwicklungen im Bereich der *In-vitro*-Methoden als auch an Erfolgen, die aus dem Bereich der *In-silico*-Toxikologie zu vermieden sind. Dies ist ein Grund, warum Alternativmethoden auch im Rahmen der REACH-Verordnung einen größeren Stellenwert einnehmen und Tierversuche ersetzen sollen, wenn dies zuverlässig möglich ist [13].

Das Vertrauen, das in Alternativmethoden gesetzt wird, lässt sich an der Umgangsweise mit Tierversuchen bei Kosmetik-Artikeln beschreiben. Nach einer Übergangsfrist von fünf Jahren ist seit 2014 die Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel in Kraft und ersetzt die zuvor bestandene nationale „Kosmetikrichtlinie“. Die neue Richtlinie verbietet in der Europäischen Union unter anderem die Durchführung von Tierversuchen für kosmetische Endprodukte, sowie für Bestandteile oder Kombinationen von Bestandteilen. Um zu unterbinden, dass entsprechende Versuche außerhalb der EU durchgeführt werden und die Produkte anschließend in die EU eingeführt werden, verbietet die Verordnung ferner das Inverkehrbringen der zuvor genannten Stoffe, wenn diese Tierversuchen unterzogen worden sind [65]. Durch die neue Kosmetikverordnung steigt der Druck auf die Kosmetikindustrie, Alternativmethoden zu entwickeln und einzusetzen, denn bis heute gibt es etwa zum Endpunkt Sensibilisierung durch Hautkontakt noch immer keine Alternativ-Methode, die vollständig OECD-validiert ist, obwohl Tierversuche bereits seit 2013 untersagt sind und intensiv auf dem Gebiet geforscht wird [150, 151, 152, 153]. In diesem Zusammenhang wurde im Jahr 2011 eine Übersichtsarbeit veröffentlicht, die sich mit Alternativmethoden für die Testung von Kosmetika beschäftigt und gängige Methoden bearbeitet [149]. Der Artikel beruft sich unter anderem auf das TTC-Konzept und physiologisch basiertes toxikokinetisches Modelling.

Das TTC-Konzept bildet einen Ansatz, mit dessen Hilfe humane Expositionsgrenzwerte ermittelt werden können, unterhalb derer ein sehr geringes und daher akzeptables Risiko für das menschliche Leben besteht. Das Konzept ist anwendbar auf Chemikalien, zu denen keine toxikologischen Daten vorhanden sind und funktioniert auf Grundlage von strukturell verwandten Stoffen bekannter Toxizität. Abbildung 5.1 veranschaulicht das TTC-Konzept und verdeutlicht, inwieweit mit dessen Hilfe bestimmt

werden kann, ob ein Stoff einer weiteren toxikologischen Untersuchung bedarf oder nicht. Während der TTC bereits für Verpackungsmaterialien für Nahrungsmittel, Nahrungsmittelzusatzstoffe und gentoxische Verunreinigungen in Arzneimitteln angewandt wird, hat die European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA) Untersuchungen dazu unterstützt, ob das TTC-Konzept auch für Kosmetikinhaltsstoffe angewendet werden könnte. Das Konzept ist abhängig von der Qualität, Vollständigkeit und Relevanz der verwendeten Datenbanken. Da bisherige TTC-Werte allerdings auf bekannter Toxizität aus Tierversuchsstudien mit oraler Verabreichung basieren, sind sie nicht ohne weiteres auf die dermale Applikation, wie sie bei Kosmetika üblich ist, anwendbar. Eine Vorgehensweise, wie der in dieser Arbeit bestimmte interne TTC, könnte dieses Problem jedoch umgehen. Der interne TTC basiert auf „internen NOAELs“ aus Tierversuchsstudien. Das sind angepasste Dosen, die mit der Fraktion der ermittelten Bioverfügbarkeit jeder einzelnen Chemikalie verrechnet werden, um daraus die verabreichten internen Dosen zu ermitteln. Durch die neue Herangehensweise der Mit-Einbeziehung der für die Stoffe ermittelten Bioverfügbarkeiten und damit dem Herausrechnen des Expositionsweges, um interne TTC-Werte zu erhalten, eröffnen sich neue Möglichkeiten für eine *route-to-route extrapolation*. Dadurch wäre es möglich, weitere Tierversuche einzusparen und der neuen Kosmetikverordnung, die Tierversuche verbietet, ein Hilfsmittel zum Umsetzen der gesteckten Ziele sein.

Eine Erhöhung der Qualität der Vorhersagen wäre aufgrund von präziseren Berechnungen der individuellen Absorptionen der Chemikalien möglich. Dies könnte durch verbesserte Algorithmen oder gar durch experimentell ermittelte Werte erreicht werden. Darüber hinaus würde ein umfangreicherer Datensatz dazu beitragen, genauere Perzentile als ermittelte Grenzwerte zu generieren. Das größte Verbesserungspotential hat allerdings die Klassifikation der Chemikalien nach Cramer, die einen struktur-basierten Separator der Chemikalien darstellt. Die sehr konservative Klassifikation ist für die ungleichmäßige Verteilung der Chemikalien in die Kategorien „nicht toxisch“, „möglicherweise toxisch“ und „wahrscheinlich“ bzw. „eindeutig toxisch“ verantwortlich. Während den ersten beiden Klassen ein nur sehr geringer Anteil der Chemikalien zugeordnet wird, gelten die meisten Chemikalien nach Cramer als toxisch. Die vorliegende Arbeit macht deutlich, dass im Bereich der Cramer-Klassifikation zum Zuordnen der Stoffe in die drei Kategorien noch zahlreiche Verbesserungen möglich und auch nötig sind, um eine verlässlichere Einteilung der Stoffe zu gewährleisten, was in einer enormen Verbesserung des (internen) TTC-Konzepts resultieren würde.

Toxikokinetik behandelt die Eintrittswege und weiteren Umformungen eines Stoffes im Körper. Nachdem eine chemische Verbindung in einen Säugetierorganismus einge-

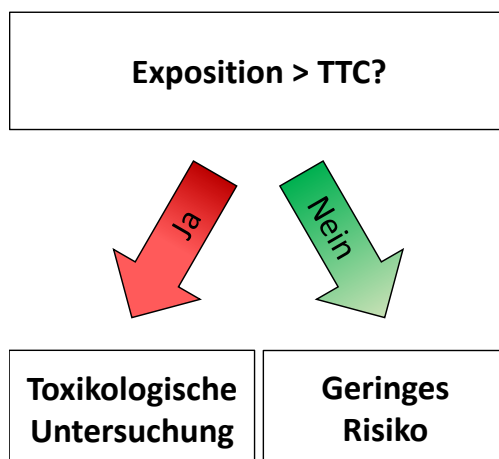


Abbildung 5.1.: Das TTC-Konzept. Bleibt die Exposition gegenüber einem Stoff unterhalb des Grenzwertes, so wird das von ihm ausgehende Risiko als kalkulierbar angesehen und es bedarf keiner weiteren Untersuchungen. Wird der Grenzwert allerdings überschritten, so sind weiterführende toxikologische Untersuchungen notwendig. Nach [154].

drungen ist, wird sie über den Blutfluss in zahlreiche Gewebe und Organe verteilt. Dort kann die Substanz an eine Vielzahl von Rezeptoren oder sonstige Targets binden, metabolisiert oder unverändert ausgeschieden werden. Die vier Prozesse Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination (ADME) beschreiben die Pharmakokinetik einer Substanz. Die Toxikokinetik basiert auf denselben Prozessen, allerdings von einem toxikologischen Standpunkt aus betrachtet. Physiologisch basiertes toxikokinetisches Modelling ist in der Lage, das Prinzip von ADME zu simulieren. Die Konzentrations-Zeit-Profile von Fremdstoffen in Geweben oder die Menge an Metaboliten, die gebildet werden, werden oftmals als Marker für die biologische Aktivität einer Substanz betrachtet [155]. Dort, wo *In-vivo*-Experimente nicht durchgeführt werden können, kann die Toxikokinetik einer Substanz mittels *In-vitro*-Tests oder *In-silico*-Modellen bestimmt werden [149]. Diese Herangehensweise wird in dieser Arbeit verdeutlicht, indem mit Ergebnissen aus *In-vitro*-Tests ein physiologisch basiertes Modell erstellt wurde, mit dessen Hilfe der Einfluss von Polymorphismen des fremdstoffmetabolisierenden Enzyms UGT2B15 auf den Metabolismus von Bisphenol A untersucht werden konnte.

Beim kinetischen Modelling der Alkoholkonzentrationen in verschiedenen biologischen Kompartimenten konnte die Fragestellung, ob während des Stillens wie auch in der Schwangerschaft ein striktes Alkoholverbot einzuhalten sei, hinreichend geklärt werden. Während in zahlreichen Empfehlungen Widersprüche vorhanden sind, und in einigen Fällen sogar das Abpumpen der Milch vor dem Alkoholenuss empfohlen wurde, konnte durch das Modell belegt werden, dass „gelegentliches Trinken“ und „kein über-

mäßiger Alkoholkonsum“ nicht zu gesundheitsgefährdenden Alkoholkonzentrationen im Kind führen. Dies wird sogar noch deutlicher, wenn die über die Muttermilch aufgenommenen Alkoholmengen mit denen verglichen werden, die nach Verabreichung des für Säuglinge geeigneten alkoholhaltigen Arzneimittels Carminativum Hetterich® erreicht werden. Lediglich bei chronischem Alkoholkonsum sollte abgestellt werden. Vereinzelt wird berichtet, dass auch geringe Mengen Alkohols den Geschmack der Milch verändern können, was eine Trinkweigerung des Säuglings zur Folge haben kann. Auch dies sollte aber bei nur gelegentlichem Konsum geringer Mengen Alkohol nicht zu Schwierigkeiten führen [80]. Physiologisch basierte toxikokinetische Modelle (PBTK) können sich also eignen, Daten aus *In-vitro*-Modellen auf die Situation *in vivo* zu extrapolieren. Dadurch kann ein entscheidender Beitrag für Alternativmethoden zum Tierversuch geleistet werden. Auch bei der Umsetzung der neuen Kosmetikverordnung des Europäischen Parlaments könnten diese Arbeiten nützlich sein.

Die hier dargestellten toxikokinetischen Modelle bilden die Realität relativ genau ab, da sie gute Übereinstimmung mit experimentell ermittelten Werten aufweisen. Um dennoch eine erhöhte Vorhersagegüte zu gewährleisten, wäre es möglich, systembiologische Aspekte zu berücksichtigen. Das Modellieren intrazellulärer Vorgänge in den einzelnen Organellen könnte präzisere Modelle ermöglichen.

Quantitative Strukturaktivitätsbeziehungen beschreiben die quantitative Beziehung zwischen der Struktur einer Substanz und der entsprechenden Wirkung. Sie nehmen zur Annahme, dass strukturell ähnliche Stoffe auch ähnliche Wirkungen entfalten können. Die Auswertung des ELINCS-Datensatzes beschränkte sich im Wesentlichen auf einen Vergleich der physikochemischen Parameter Molekulargewicht, Dampfdruck, Oktanol-Wasserkoeffizient (LogP) und Löslichkeit sowie auf die ermittelten *effect levels* NOEL und LOEL mit der RepDose-Datenbank des Fraunhofer Instituts für Toxikologie und Experimentelle Medizin. Da bei der Erstellung der ELINCS-Datenbank das Design der RepDose-Datenbank übernommen wurde, waren Vergleiche ohne größeren Aufwand möglich. Die Vergleiche zeigten Übereinstimmungen der Datensätze, die eine weitergehende Arbeit möglich machen. Zusätzlich wurden bei der ELINCS-Datenbank die Parameter Molekulargewicht sowie LogP zur Toxizität aufgetragen. Wie erwartet konnte festgestellt werden, dass Stoffe mit niedrigerem Molekulargewicht eine höhere Toxizität aufwiesen als Stoffe mit hohem Molekulargewicht. Dies entspricht den Erwartungen, da größere Moleküle in geringerem Maße resorbiert werden als kleinere Moleküle. Bei der Auswertung der ELINCS-Datenbank wurde auch deutlich, dass eine zu differenzierte Erfassung der Endpunkte gegebenenfalls zu einer sehr geringen Dichte ebendieser führen kann. So wie in der Leber, in der nur erhöhtes Gewicht und Hypertrophie in

größeren Zahlen auftrat und weitere Effekte nur vereinzelt auftraten. Bei der Niere konnte gar nur erhöhtes Gewicht in größeren Zahlen ermittelt werden, wobei Gewichtsveränderungen an den Organen meist unspezifisch sind. Durch eine Zusammenlegung einzelner Effekte konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Hier sind weitergehende Arbeiten nötig. Eine Verknüpfung der strukturellen, wie auch der toxikologischen Dimensionen der Stoffe beider Datensätze würde es ermöglichen, prädiktive Modelle zu entwickeln, die anhand der Struktur eines Stoffes Rückschlüsse auf die ihm anhaftende Toxizität ermöglichen würden.

Durch diese Arbeit konnte ein umfassender Überblick über verschiedene Methoden computergestützter Analysen in der Toxikologie erstellt werden. Angefangen mit der Erstellung und Auswertung einer umfangreichen Datenbank aus den ELINCS-Stoffen, die zusammen mit der RepDose-Datenbank einen vergleichsweise großen Datenpool bildet, über die Erstellung von TTC-Werten auf Daten der ELINCS-Datenbank, der FCM- und Munro-Datenbank, bis hin zu toxikokinetischem Modelling.

Literaturverzeichnis

- [1] Gesellschaft für Toxikologie e.V. Toxikologie in Deutschland 2015. Report, 2015.
- [2] OECD. OECD principles for the validation, for regulatory purposes, of (quantitative) structure-activity relationship models. Report, 2004.
- [3] European Commission. The EU Framework Programme for Research and Innovation. <http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/>. 2014-12-20.
- [4] J. Blake. Mémoire sur les effets de diverses substances salines injectées dans le système circulatoire. *Archives générales de médecine*, page 115, 1839.
- [5] J. Blake. On the action of certain Inorganic Compounds when introduced directly into the Blood. *Proceedings of the Royal Society of London*, n/a(4):285, 1841.
- [6] A. Arora. *Introductory Organic Chemistry*. Discovery Publishing House, 2006.
- [7] W. Sneader. *Drug Discovery: A History*. John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
- [8] A. Crum Brown and T. R. Fraser. On the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases, derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia and Nicotia. *Trans. Roy. Soc. Edin.*, 25:151–203, 1869.
- [9] R. Panchagnula and N. S. Thomas. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *Int J Pharm*, 201(2):131–50, 2000.
- [10] M. Tusar, N. Minovski, N. Fjodorova, and M. Novic. In silico assessment of adverse effects of a large set of 6-fluoroquinolones obtained from a study of tuberculosis chemotherapy. *Curr Drug Saf*, 7(4):313–20, 2012.
- [11] J. M. Domagala. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother*, 33(4):685–706, 1994.
- [12] D. C. Hooper and E. Rubinstein. *Quinolone Antimicrobial Agents*, book section 1, pages 3–18. ASM Press, 3rd edition, 2003.

- [13] U. Lahl and U. Gundert-Remy. The Use of (Q)SAR Methods in the Context of REACH. *Toxicol Mech Methods*, 18(2-3):149–58, 2008.
- [14] C. Ruden and S. O. Hansson. Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals (REACH) is but the first step-how far will it take us? Six further steps to improve the European chemicals legislation. *Environ Health Perspect*, 118(1):6–10, 2010.
- [15] A. Bitsch. Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen - hohe Anforderungen unter REACH an eine intelligente Teststrategie. *B208 GvU, 15. Erg.Lfg. 3/10*, 2010.
- [16] T. Hofer, I. Gerner, U. Gundert-Remy, M. Liebsch, A. Schulte, H. Spielmann, R. Vogel, and K. Wettig. Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Arch Toxicol*, 78(10):549–64, 2004.
- [17] A. Bitsch, S. Jacobi, C. Melber, U. Wahnschaffe, N. Simetska, and I. Mangelsdorf. REPDOSE: A database on repeated dose toxicity studies of commercial chemicals - A multifunctional tool. *Regul Toxicol Pharmacol*, 46(3):202–10, 2006.
- [18] P. Mazzatorta, M. D. Estevez, M. Coulet, and B. Schilter. Modeling oral rat chronic toxicity. *J Chem Inf Model*, 48(10):1949–54, 2008.
- [19] H. J.M. Verhaar, W. Mulder, and J. L. M Hermes. QSARs for ecotoxicity. In: Overview of structure-activity relationships for environmental endpoints. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/information-sources/qsar-document-area/QSAR_environ_background.pdf. 2015-10-16.
- [20] C. L. Russom, S. P. Bradbury, S. J. Broderius, D. J. Hammermeister, and R. A. Drummond. Predicting modes of toxic action from chemical structure: Acute toxicity in the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem*, 16(5):948–967, 1997.
- [21] C. L. Russom, S. P. Bradbury, S. J. Broderius, D. J. Hammermeister, R. A. Drummond, and G. D. Veith. Predicting modes of toxic action from chemical structure. *Environ Toxicol Chem*, 32(7):1441–2, 2013.
- [22] T. R. Stouch, J. R. Kenyon, S. R. Johnson, X. Q. Chen, A. Doweyko, and Y. Li. In silico ADME/Tox: why models fail. *J Comput Aided Mol Des*, 17(2-4):83–92, 2003.

- [23] T. Miyao, M. Arakawa, and K. Funatsu. Exhaustive Structure Generation for Inverse-QSPR/QSAR. *Mol Inf*, 29:111–125, 2010.
- [24] M. K. Leong, S. W. Lin, H. B. Chen, and F. Y. Tsai. Predicting mutagenicity of aromatic amines by various machine learning approaches. *Toxicol Sci*, 116(2):498–513, 2010.
- [25] F. T. Barabair, H. Olsson, and B. Sokull-Klüttgen. European List of Notified Chemical Substances - ELINCS. JRC Scientific and Technical Reports, 2009.
- [26] B. Rupp, K. E. Appel, and U. Gundert-Remy. Chronic oral LOAEL prediction by using a commercially available computational QSAR tool. *Arch Toxicol*, 84(9):681–8, 2010.
- [27] K.E. Appel, B. Rupp, and U. Gundert-Remy. *Das Instrument der „in silico“ Toxikologie - schon reif für quantitative Schlussfolgerungen?*, pages 1–4. Erich Schmidt Verlag, 2010.
- [28] A. Handl. *Statistik und ihre Anwendungen - Multivariate Analysemethoden*. Springer-Verlag, 2nd edition, 2010.
- [29] A. M. Gessner and T. Arndt. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2nd edition, 2013.
- [30] K. Dörner. *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie*. Thieme, 8th edition, 2013.
- [31] EFSA. Scientific Opinion on Risk Assessment for a Selected Group of Pesticides from the Triazole Group to Test Possible Methodologies to Assess Cumulative Effects from Exposure through Food from these Pesticides on Human Health. *EFSA J*, 7(9):1167, 2009.
- [32] F. Partosch, H. Mielke, R. Stahlmann, B. Kleuser, S. Barlow, and U. Gundert-Remy. Internal threshold of toxicological concern values: enabling route-to-route extrapolation. *Arch Toxicol*, 2014.
- [33] E. C. Hennes. An overview of values for the threshold of toxicological concern. *Toxicol Lett*, 211(3):296–303, 2012.
- [34] European Food Safety Authority (EFSA). FAQ on the Threshold of Toxicological Concern. <http://www.efsa.europa.eu/de/faqs/faqttc.htm>. 2014-10-17.

- [35] J. P. Frawley. Scientific evidence and common sense as a basis for food-packaging regulations. *Food Cosmet Toxicol*, 5(3):293–308, 1967.
- [36] S. Barlow. Threshold of Toxicological Concern (TTC) - A tool for assessing substances of unknown toxicity present at low levels in the diet. *ILSI Europe Concise Monograph Series*, pages 1–32, 2005.
- [37] L. S. Gold, C. B. Sawyer, R. Magaw, G. M. Backman, M. de Veciana, R. Levinson, N. K. Hooper, W. R. Havender, L. Bernstein, R. Peto, and et al. A carcinogenic potency database of the standardized results of animal bioassays. *Environ Health Perspect*, 58:9–319, 1984.
- [38] L. S. Gold, T. H. Slone, and L. Bernstein. Summary of carcinogenic potency and positivity for 492 rodent carcinogens in the carcinogenic potency database. *Environ Health Perspect*, 79:259–72, 1989.
- [39] S. M. Barlow, G. Kozianowski, G. Wurtzen, and J. Schlatter. Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet. Report of a workshop, 5-6 October 1999, Paris, France. *Food Chem Toxicol*, 39(9):893–905, 2001.
- [40] M. A. Cheeseman, E. J. Machuga, and A. B. Bailey. A tiered approach to threshold of regulation. *Food Chem Toxicol*, 37(4):387–412, 1999.
- [41] R. Kroes, A. G. Renwick, M. Cheeseman, J. Kleiner, I. Mangelsdorf, A. Piersma, B. Schilter, J. Schlatter, F. van Schothorst, J. G. Vos, G. Wurtzen, and Institute European branch of the International Life Sciences. Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food Chem Toxicol*, 42(1):65–83, 2004.
- [42] I. C. Munro, R. A. Ford, E. Kennepohl, and J. G. Sprenger. Thresholds of toxicological concern based on structure-activity relationships. *Drug Metab Rev*, 28(1-2):209–17, 1996.
- [43] R. Kroes, C. Galli, I. Munro, B. Schilter, L. Tran, R. Walker, and G. Wurtzen. Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing. *Food Chem Toxicol*, 38(2-3):255–312, 2000.
- [44] European commission JRC Institute for Health and Consumer Protection. ESIS : European chemical Substances Information System. <http://esis.jrc.ec.europa.eu/index.php?PGM=eli>. 2012-09-25.

- [45] H. Kalkhof, M. Herzler, R. Stahlmann, and U. Gundert-Remy. Threshold of toxicological concern values for non-genotoxic effects in industrial chemicals: re-evaluation of the Cramer classification. *Arch Toxicol*, 86(1):17–25, 2012.
- [46] R. Pinalli, C. Croera, A. Theobald, and A. Feigenbaum. Threshold of toxicological concern approach for the risk assessment of substances used for the manufacture of plastic food contact materials. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9):523–534, 2011.
- [47] S. E. Escher, I. Tluczkiewicz, M. Batke, A. Bitsch, C. Melber, E. D. Kroese, H. E. Buist, and I. Mangelsdorf. Evaluation of inhalation TTC values with the database RepDose. *Regul Toxicol Pharmacol*, 58(2):259–74, 2010.
- [48] EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC). page 103, 2012. *EFSA Journal* 2012;10(7):2750.
- [49] I. Dewhurst and A. G. Renwick. Evaluation of the Threshold of Toxicological Concern (TTC)–challenges and approaches. *Regul Toxicol Pharmacol*, 65(1):168–77, 2013.
- [50] A. G. Renwick. Data-derived safety factors for the evaluation of food additives and environmental contaminants. *Food Addit Contam*, 10(3):275–305, 1993.
- [51] Europäische Union. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), Opinion on Use of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) Approach for Human Safety Assessment of Chemical Substances with focus on Cosmetics and Consumer Products. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_092.pdf. 2012-10-10.
- [52] World Health Organization. Evaluation of certain food additives: 56th report of the Joint FAO/WHO. WHO Technical Report Series, 2006.
- [53] G. M. Cramer, R. A. Ford, and R. L. Hall. Estimation of toxic hazard - a decision tree approach. *Food Cosmet Toxicol*, 16(3):255–76, 1978.
- [54] I. C. Munro, E. Kennepohl, and R. Kroes. A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Food Chem Toxicol*, 37(2-3):207–32, 1999.

- [55] D. Weininger. SMILES, a Chemical Language and Information System. 1. Introduction to Methodology and Encoding Rules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 28:31–36, 1988.
- [56] D. Weininger, A. Weininger, and J. L. Weininger. SMILES. 2. Algorithm for Generation of Unique SMILES Notation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 29:97–101, 1989.
- [57] G. Patlewicz, N. Jeliaskova, R. J. Safford, A. P. Worth, and B. Aleksiev. An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. *SAR QSAR Environ Res*, 19(5-6):495–524, 2008.
- [58] D. P. Reynolds, K. Lanevskij, P. Japertas, R. Didziapetris, and A. Petrauskas. Ionization-specific analysis of human intestinal absorption. *J Pharm Sci*, 98(11):4039–54, 2009.
- [59] A. Boobis, U. Gundert-Remy, P. Kremers, P. Macheras, and O. Pelkonen. In silico prediction of ADME and pharmacokinetics. Report of an expert meeting organised by COST B15. *Eur J Pharm Sci*, 17(4-5):183–93, 2002.
- [60] N. M. O’Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, and G. R. Hutchison. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform*, 3:33, 2011.
- [61] F. Kalberlah and K. Schneider. Examination of the data as the basis for the quantification of extrapolation factors. In: Final report of the research project No. 116 06 113 of the German Federal Environmental Agency, p 797. Report, Umweltbundesamt, 1998.
- [62] K. Schneider, M. Hassauer, J. Oltmanns, U. Schuhmacher-Wolz, E. Elmhäuser, and O. Mosbach-Schulz. Uncertainty analysis in workplace effect assessment. Federal Institute for Occupational Safety and Health, Dortmund/Berlin/Dresden, pp 40–55. Report, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), 2005.
- [63] European Commission. Synoptic document - provisional list of monomers and additives notified to European Commission as substances which may be used in the manufacture of plastics or coatings intended to come into contact with foodstuffs. http://www.contactalimentaire.com/fileadmin/ImageFichier_Archive/contact_alimentaire/Fichiers_Documents/Avis_de_AESA/synoptic_doc_en_-_version_June_2005.pdf. 2014-10-08.

- [64] World Health Organization. Harmonization Project Document No. 2: Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability: Guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment. Report, 2005.
- [65] Zusammenfassung der EU-Gesetzgebung. http://europa.eu/legislation_summaries/consumers/product_labelling_and_packaging/co0013_de.htm. 2014-12-07.
- [66] K. Hauge-Nilsen and D. Keller. Feasibility study: refinement of the TTC concept by additional rules based on in silico and experimental data. *Arch Toxicol*, 89(1):25–32, 2015.
- [67] S. Bhatia, T. Schultz, D. Roberts, J. Shen, L. Kromidas, and A. Marie Api. Comparison of Cramer classification between Toxtree, the OECD QSAR Toolbox and expert judgment. *Regul Toxicol Pharmacol*, 71(1):52–62, 2015.
- [68] T. Teorell. Kinetics of distribution of substances administered to the body. i. the extravascular modes of administration. *Arch Int Pharmacodyn Thér*, 57:205–25, 1937.
- [69] R. Mehvar. Interdependency of pharmacokinetic parameters: a chicken-and-egg problem? Not! *J Pharm Pharm Sci*, 9(1):113–8, 2006.
- [70] Aktories, Förstermann, Hofmann, and Starke. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer, 10th edition, 2009.
- [71] Y. J. Kelly, A. Sacker, R. Gray, J. Kelly, D. Wolke, J. Head, and M. A. Quigley. Light drinking during pregnancy: still no increased risk for socioemotional difficulties or cognitive deficits at 5 years of age? *J Epidemiol Community Health*, 66(1):41–8, 2012.
- [72] C. M. O’Leary, N. Nassar, S. R. Zubrick, J. J. Kurinczuk, F. Stanley, and C. Bower. Evidence of a complex association between dose, pattern and timing of prenatal alcohol exposure and child behaviour problems. *Addiction*, 105(1):74–86, 2010.
- [73] H. Marquardt, S. G. Schäfer, and H. Barth. *Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 3rd edition, 2013.
- [74] G. Carson, L. V. Cox, J. Crane, P. Croteau, L. Graves, S. Kluka, G. Koren, M. J. Martel, D. Midmer, I. Nulman, N. Poole, V. Senikas, R. Wood, Obstetricians

- Society of, and Canada Gynaecologists of. Alcohol use and pregnancy consensus clinical guidelines. *J Obstet Gynaecol Can*, 32(8 Suppl 3):S1–31, 2010.
- [75] U. Gundert-Remy, F. Partosch, H. Mielke, and R. Stahlmann. Alkohol und Stillen - Eine Risikoabschätzung auf Grundlage von physiologisch basierter Modellierung von Alkoholkonzentrationen im Säugling. *Umweltmed Forsch Prax*, 17(1):17–25, 2012.
- [76] M. B. Haastrup, A. Pottegard, and P. Damkier. Alcohol and breastfeeding. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114(2):168–73, 2014.
- [77] Carl Ernst Bock. *Das Buch vom gesunden und kranken Menschen*. Verlag von Ernst Keils Nachfolger, Leipzig, 16th edition, 1898.
- [78] Heinz Scheibenpflug. *Das Hausbuch der Frau*. Deutsche Buch-Gemeinschaft Berlin und Darmstadt, 1957.
- [79] Y. A. Kesäniemi. Ethanol and acetaldehyde in the milk and peripheral blood of lactating women after ethanol administration. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, 81(1):84–6, 1974.
- [80] C. Schaefer, H. Spielmann, K. Vetter, and C. Weber-Schöndorfer. *Arzneimittel in Schwangerschaft und Stillzeit*. Urban & Fischer, 8th edition, 2012.
- [81] Agence Nationale d’Accréditation et d’Évaluation en Santé. Breastfeeding? Initiation and continuation during the first 6 months of life. Guidelines. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/breastfeeding_guidelines.pdf. 2014-10-30.
- [82] Public Health Agency of Canada. Drinking alcohol while breastfeeding. http://www.beststart.org/resources/alc_reduction/pdf/brstfd_alc_deskref_eng.pdf. 2014-10-30.
- [83] Schweizerische Gesellschaft für Ernährung. Ernährung während der Stillzeit. http://www.sge-ssn.ch/media/merkblatt_ernaehrung_waehrend_der_stillzeit_20111.pdf. 2015-10-16.
- [84] Australian Breastfeeding Association. Alcohol and breastfeeding: a guide for mothers. https://www.breastfeeding.asn.au/system/files/ABA_Alcohol_BF%20for%20website.pdf. 2014-10-30.

- [85] Australian Government & National Health and Medical Research Council. Australian Guidelines to reduce health risks from drinking alcohol: Guideline 4 Pregnancy and breastfeeding. 2009.
- [86] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Alkohol in Schwangerschaft und Stillzeit. <http://www.bfr.bund.de/cm/343/alkohol-in-schwangerschaft-und-stillzeit.pdf>, 2011.
- [87] K. Abraham, H. Mielke, W. Huisinga, and U. Gundert-Remy. Elevated internal exposure of children in simulated acute inhalation of volatile organic compounds: effects of concentration and duration. *Arch Toxicol*, 79(2):63–73, 2005.
- [88] H. Mielke and U. Gundert-Remy. Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett*, 190(1):32–40, 2009.
- [89] H. Mielke, F. Partosch, and U. Gundert-Remy. The contribution of dermal exposure to the internal exposure of bisphenol A in man. *Toxicol Lett*, 204(2-3):190–8, 2011.
- [90] K. Abraham, H. Mielke, W. Huisinga, and U. Gundert-Remy. Internal exposure of children by simulated acute inhalation of volatile organic compounds: the influence of chemical properties on the child/adult concentration ratio. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96(3):242–3, 2005.
- [91] H. Mielke, K. Abraham, M. Gotz, B. Vieth, A. Lampen, A. Luch, and U. Gundert-Remy. Physiologically based toxicokinetic modelling as a tool to assess target organ toxicity in route-to-route extrapolation—the case of coumarin. *Toxicol Lett*, 202(2):100–10, 2011.
- [92] International Commission on Radiological Protection. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: Reference values. *Elsevier Science, Amsterdam*, CRP Publication 89, 2002.
- [93] Y. C. Chien, J. F. Liu, Y. J. Huang, C. S. Hsu, and J. C. Chao. Alcohol levels in Chinese lactating mothers after consumption of alcoholic diet during postpartum "doing-the-month" ritual. *Alcohol*, 37(3):143–50, 2005.
- [94] M. E. Lawton. Alcohol in breast milk. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 25(1):71–3, 1985.
- [95] W. Schmitt. General approach for the calculation of tissue to plasma partition coefficients. *Toxicol In Vitro*, 22(2):457–67, 2008.

- [96] R. Schipphan, S. Wagler, and D Zschoke. Untersuchungen zur Äthanol elimination im Kindesalter. *Kinderärztliche Praxis*, 43:193–201, 1975.
- [97] E. Baraona, C. S. Abittan, K. Dohmen, M. Moretti, G. Pozzato, Z. W. Chayes, C. Schaefer, and C. S. Lieber. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(4):502–7, 2001.
- [98] G. M. Pastino, E. J. Flynn, and L. G. Sultatos. Genetic polymorphisms in ethanol metabolism: issues and goals for physiologically based pharmacokinetic modeling. *Drug Chem Toxicol*, 23(1):179–201, 2000.
- [99] M. Y. Pepino, A. L. Steinmeyer, and J. A. Mennella. Lactational state modifies alcohol pharmacokinetics in women. *Alcohol Clin Exp Res*, 31(6):909–18, 2007.
- [100] A. W. Jones. Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. *Forensic Sci Int*, 200(1-3):1–20, 2010.
- [101] G. G. Briggs and R. K. Freeman. *Drugs in Pregnancy and Lactation*. Wolters Kluwer, 10th edition, 2014.
- [102] V. A. da Silva, L. R. Malheiros, A. R. Moraes-Santos, M. A. Barzano, and A. E. McLean. Ethanol pharmacokinetics in lactating women. *Braz J Med Biol Res*, 26(10):1097–103, 1993.
- [103] S. Röskam and M. Koch. Effects of neonatal and peripubertal ethanol treatment on various aspects of adult rat behavior and brain anatomy. *Int J Dev Neurosci*, 27(3):249–56, 2009.
- [104] T. Miki, H. Kuma, T. Yokoyama, K. Sumitani, Y. Matsumoto, T. Kusaka, K. Warita, Z. Y. Wang, N. Hosomi, T. Imagawa, S. Bedi K, S. Itoh, Y. Nakamura, and Y. Takeuchi. Early postnatal ethanol exposure induces fluctuation in the expression of BDNF mRNA in the developing rat hippocampus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 68(4):484–93, 2008.
- [105] M. Saito, G. Chakraborty, R. F. Mao, S. M. Paik, C. Vadasz, and M. Saito. Tau phosphorylation and cleavage in ethanol-induced neurodegeneration in the developing mouse brain. *Neurochem Res*, 35(4):651–9, 2010.
- [106] T. Takadera and T. Ohyashiki. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors prevent caspase-dependent apoptosis induced by ethanol in cultured rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol*, 499(3):239–45, 2004.

- [107] E. Defranchi, A. Novellino, M. Whelan, S. Vogel, T. Ramirez, B. van Ravenzwaay, and R. Landsiedel. Feasibility Assessment of Micro-Electrode Chip Assay as a Method of Detecting Neurotoxicity in vitro. *Front Neuroeng*, 4:6, 2011.
- [108] C. R. Azara, I. C. Maia, C. N. Rangel, M. A. Silva-Neto, R. F. Serpa, E. F. De Jesus, M. G. Do Carmo, and E. Fialho. Ethanol intake during lactation alters milk nutrient composition and growth and mineral status of rat pups. *Biol Res*, 41(3):317–30, 2008.
- [109] R. E. Little, K. W. Anderson, C. H. Ervin, B. Worthington-Roberts, and S. K. Clarren. Maternal alcohol use during breast-feeding and infant mental and motor development at one year. *N Engl J Med*, 321(7):425–30, 1989.
- [110] R. E. Little, K. Northstone, J. Golding, and Alspac Study Team. Alcohol, breast-feeding, and development at 18 months. *Pediatrics*, 109(5):E72–2, 2002.
- [111] B. S. Rubin. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127(1-2):27–34, 2011.
- [112] Pubchem Open Chemistry Database. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623?from=summary#section=Top>, 2014. 20014-10-29.
- [113] Europäische Union. Updated Risk Assessment Report: 4,4-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A). <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/15069/1/lbna24589enn.pdf>. 2014-10-21.
- [114] European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE; Question number EFSA-Q-2005-100. *EFSA J*, 428:1 – 75, 2006.
- [115] T. Takeuchi and O. Tsutsumi. Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(1):76–8, 2002.
- [116] S. Vandentorren, F. Zeman, L. Morin, H. Sarter, M. L. Bidondo, A. Oleko, and H. Leridon. Bisphenol-A and phthalates contamination of urine samples by catheters in the Elfe pilot study: implications for large-scale biomonitoring studies. *Environ Res*, 111(6):761–4, 2011.

- [117] T. Geens, D. Aerts, C. Berthot, J. P. Bourguignon, L. Goeyens, P. Lecomte, G. Maghuin-Rogister, A. M. Pironnet, L. Pussemier, M. L. Scippo, J. Van Loco, and A. Covaci. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol*, 50(10):3725–40, 2012.
- [118] N. Hanioka, T. Naito, and S. Narimatsu. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere*, 74(1):33–6, 2008.
- [119] F. Partosch, H. Mielke, and U. Gundert-Remy. Functional UDP-glucuronyltransferase 2B15 polymorphism and bisphenol A concentrations in blood: results from physiologically based kinetic modelling. *Arch Toxicol*, 87(7):1257–64, 2013.
- [120] Y. Ikezuki, O. Tsutsumi, Y. Takai, Y. Kamei, and Y. Taketani. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod*, 17(11):2839–41, 2002.
- [121] N. Arnich, M. C. Canivenc-Lavier, M. Kolf-Clauw, H. Coffigny, J. P. Cravedi, K. Grob, A. C. Macherey, D. Masset, R. Maximilien, J. F. Narbonne, F. Nesslany, J. Stadler, and J. Tulliez. Conclusions of the French Food Safety Agency on the toxicity of bisphenol A. *Int J Hyg Environ Health*, 214(3):271–5, 2011.
- [122] J. G. Hengstler, H. Foth, T. Gebel, P. J. Kramer, W. Lilienblum, H. Schweinfurth, W. Volkel, K. M. Wollin, and U. Gundert-Remy. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Crit Rev Toxicol*, 41(4):263–91, 2011.
- [123] European Food Safety Authority (EFSA). Call for Bisphenol A occurrence data in food and beverages intended for human consumption, migration data from and occurrence data in food contact materials. *EFSA J*, 9:2475, 2011.
- [124] W. Dekant and W. Volkel. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol*, 228(1):114–34, 2008.
- [125] S. Biedermann, P. Tschudin, and K. Grob. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem*, 398(1):571–6, 2010.
- [126] W. Völkel, T. Colnot, G. A. Csanady, J. G. Filser, and W. Dekant. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*, 15(10):1281–7, 2002.

- [127] J. G. Teeguarden, A. M. Calafat, X. Ye, D. R. Doerge, M. I. Churchwell, R. Gunawan, and M. K. Graham. Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol a during high-dietary exposure. *Toxicol Sci*, 123(1):48–57, 2011.
- [128] J. W. Fisher, N. C. Twaddle, M. Vanlandingham, and D. R. Doerge. Pharmacokinetic modeling: prediction and evaluation of route dependent dosimetry of bisphenol A in monkeys with extrapolation to humans. *Toxicol Appl Pharmacol*, 257(1):122–36, 2011.
- [129] A. N. Edginton and L. Ritter. Predicting plasma concentrations of bisphenol A in children younger than 2 years of age after typical feeding schedules, using a physiologically based toxicokinetic model. *Environ Health Perspect*, 117(4):645–52, 2009.
- [130] H. Yamada, I. Furuta, E. H. Kato, S. Kataoka, Y. Usuki, G. Kobashi, F. Sata, R. Kishi, and S. Fujimoto. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol*, 16(6):735–9, 2002.
- [131] T. Takeuchi, O. Tsutsumi, Y. Ikezaki, Y. Takai, and Y. Taketani. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J*, 51(2):165–9, 2004.
- [132] G. Schönfelder, W. Wittfoht, H. Hopp, C. E. Talsness, M. Paul, and I. Chahoud. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*, 110(11):A703–7, 2002.
- [133] D. A. Markham, Jr. Waechter, J. M., M. Wimber, N. Rao, P. Connolly, J. C. Chuang, S. Hentges, R. N. Shiotsuka, S. Dimond, and A. H. Chappelle. Development of a method for the determination of bisphenol A at trace concentrations in human blood and urine and elucidation of factors influencing method accuracy and sensitivity. *J Anal Toxicol*, 34(6):293–303, 2010.
- [134] L. N. Vandenberg, R. R. Gerona, K. Kannan, J. A. Taylor, R. B. van Breemen, C. A. Dickenson, C. Liao, Y. Yuan, R. R. Newbold, V. Padmanabhan, F. S. Vom Saal, and T. J. Woodruff. A round robin approach to the analysis of bisphenolA (BPA) in human blood samples. *Environ Health*, 13(1):25, 2014.
- [135] H. Mielke and U. Gundert-Remy. Physiologically based toxicokinetic modelling as a tool to support risk assessment: three case studies. *J Toxicol*, 2012:359471, 2012.

- [136] W. Völkel, N. Bittner, and W. Dekant. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 33(11):1748–57, 2005.
- [137] W. Völkel, M. Kiranoglu, and H. Fromme. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett*, 179(3):155–62, 2008.
- [138] M. H. Court, Q. Hao, S. Krishnaswamy, T. Bekaii-Saab, A. Al-Rohaimi, L. L. von Moltke, and D. J. Greenblatt. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y genotype and gender are major determinants of oxazepam glucuronidation by human liver. *J Pharmacol Exp Ther*, 310(2):656–65, 2004.
- [139] M. H. Court. Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol*, 400:104–16, 2005.
- [140] J. Y. Chung, J. Y. Cho, K. S. Yu, J. R. Kim, H. R. Jung, K. S. Lim, I. J. Jang, and S. G. Shin. Effect of the UGT2B15 genotype on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug interactions of intravenous lorazepam in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 77(6):486–94, 2005.
- [141] X. He, L. M. Hesse, S. Hazarika, G. Masse, J. S. Harmatz, D. J. Greenblatt, and M. H. Court. Evidence for oxazepam as an in vivo probe of UGT2B15: oxazepam clearance is reduced by UGT2B15 D85Y polymorphism but unaffected by UGT2B17 deletion. *Br J Clin Pharmacol*, 68(5):721–30, 2009.
- [142] N. Hanioka, H. Oka, K. Nagaoka, S. Ikushiro, and S. Narimatsu. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation. *Arch Toxicol*, 85(11):1373–81, 2011.
- [143] R. K. Kuester and I. G. Sipes. Prediction of metabolic clearance of bisphenol a (4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane) using cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 35(10):1910–1915, 2007.
- [144] H. Kurebayashi, K. Okudaira, and Y. Ohno. Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett*, 198(2):210–5, 2010.
- [145] C. S. Mazur, J. F. Kenneke, J. K. Hess-Wilson, and J. C. Lipscomb. Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and

- the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metab Dispos*, 38(12):2232–8, 2010.
- [146] T. Tsukioka, J. Terasawa, S. Sato, Y. Hatayama, T. Makino, and H. Nakazawa. Development of Analytical Method for Determining Trace Amounts of BPA in Urine Samples and Estimation of Exposure to BPA. *J Environ Chem*, 14(1):57–63, 2004.
- [147] J. S. Lakind and D. Q. Naiman. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 21(3):272–9, 2011.
- [148] G. A. Csanády, H. R. Oberste-Frielinghaus, B. Semder, C. Baur, K. T. Schneider, and J. G. Filser. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol*, 76(5-6):299–305, 2002.
- [149] S. Adler, D. Basketter, S. Creton, O. Pelkonen, J. van Benthem, V. Zuang, K. E. Andersen, A. Angers-Loustau, A. Aptula, A. Bal-Price, E. Benfenati, U. Bernauer, J. Bessems, F. Y. Bois, A. Boobis, E. Brandon, S. Bremer, T. Broschard, S. Casati, S. Coecke, R. Corvi, M. Cronin, G. Daston, W. Dekant, S. Felter, E. Grignard, U. Gundert-Remy, T. Heinonen, I. Kimber, J. Kleinjans, H. Komulainen, R. Kreiling, J. Kreysa, S. B. Leite, G. Loizou, G. Maxwell, P. Mazzatorta, S. Munn, S. Pfuhler, P. Phrakonkham, A. Piersma, A. Poth, P. Prieto, G. Repetto, V. Rogiers, G. Schoeters, M. Schwarz, R. Serafimova, H. Tahti, E. Testai, J. van Delft, H. van Loveren, M. Vincken, A. Worth, and J. M. Zaldivar. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol*, 85(5):367–485, 2011.
- [150] D. Basketter, N. Alepee, S. Casati, J. Crozier, D. Eigler, P. Griem, B. Hubesch, J. de Knecht, R. Landsiedel, K. Louekari, I. Manou, G. Maxwell, A. Mehling, T. Netzeva, T. Petry, and L. H. Rossi. Skin sensitisation—moving forward with non-animal testing strategies for regulatory purposes in the EU. *Regul Toxicol Pharmacol*, 67(3):531–5, 2013.
- [151] F. Oesch, E. Fabian, K. Guth, and R. Landsiedel. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Arch Toxicol*, 88(12):2135–90, 2014.
- [152] T. Ramirez, A. Mehling, S. N. Kolle, C. J. Wruck, W. Teubner, T. Eltze, A. Aumann, D. Urbisch, B. van Ravenzwaay, and R. Landsiedel. LuSens: a keratinocyte

- based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro*, 28(8):1482–97, 2014.
- [153] D. Urbisch, A. Mehling, K. Guth, T. Ramirez, N. Honarvar, S. Kolle, R. Landsiedel, J. Jaworska, P. S. Kern, F. Gerberick, A. Natsch, R. Emter, T. Ashikaga, M. Miyazawa, and H. Sakaguchi. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2014.
- [154] I. Mangelsdorf. Die Anwendung des TTC-Konzepts zur Beurteilung der Toxizität von Chemikalien. http://www.bfr.bund.de/cm/343/die_anwendung_des_ttc_konzepts_zur_beurteilung_der_toxizitaet_von_chemikalien.pdf. 2014-10-22.
- [155] K. E. Andersen, A. Volund, and S. Frankild. The guinea pig maximization test—with a multiple dose design. *Acta Derm Venereol*, 75(6):463–9, 1995.

A. Anhang

Die folgende Liste enthält eine Aufzählung sämtlicher 877 Stoffe, die in der Datenbank verzeichnet werden sollten. Dies beinhaltet einige Übungsdatensätze, die nicht immer den nötigen Parametern entsprachen. Darüber hinaus sind solche Einträge gekennzeichnet, die nicht in die Datenbank übernommen wurden. Eine Begründung steht bei. Dabei steht (I) für Studien mit inhalativer Verabreichung, entsprechend steht (D) für Studien dermalen Applikation. (S) bedeutet, dass der Stoff schon unter einem anderen Aktenzeichen (Synonym) verzeichnet ist. (F) steht für eine fehlerhafte Studie, die nicht die erforderlichen Daten zur Verfügung stellte. Bei einigen Studien waren keine Daten (KD) zu subakuten oder subchronischen Zeiträumen vorhanden. Des Weiteren waren bei einigen Stoffen keine Akten (KA) im Archiv des BfR hinterlegt. Die Übungsdatensätze, die zur Eingewöhnung der Datenbank eingegeben wurden, aber nicht zwangsweise den Voraussetzungen entsprachen sind mit (Ü) gekennzeichnet.

00-01-0622	00-02-0256	00-02-0257	00-02-0263
00-02-0265	00-02-0267	00-02-0277	00-02-0278
00-02-0282 (KD)	00-02-0300	00-03-0462	00-03-0466
00-03-0468	00-03-0470	00-03-0481	00-03-0482
00-04-1216 (Ü)	00-04-1217 (S)	00-04-1218	00-04-1221
00-04-1222	00-04-1226	00-04-1231	00-04-1233 (Ü)
00-04-1234	00-04-1245 (Ü)	00-04-1266	00-04-1267
00-04-1268 (Ü)	00-04-1271	00-04-1274	00-04-1284 (KA)
00-04-1285	00-04-1287	00-04-1289	00-04-1292
00-04-1300 (S)	00-04-1314	00-04-1320 (Ü)	00-04-1321
00-05-0361	00-05-0363	00-05-0365	00-05-0376
00-05-0378	00-05-0385	00-06-1321 (S)	00-06-1323
00-06-1325	00-06-1334	00-06-1336	00-06-1342
00-06-1343	00-06-1345	00-06-1346	00-06-1350
00-06-1366	00-06-1367	00-06-1376 (KD)	00-06-1377
00-06-1378	00-06-1390	00-06-1401	00-06-1402
00-06-1403	00-06-1410	00-06-1412	00-06-1417

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

A. Anhang

00-06-1421	00-06-1427	00-06-1429	00-06-1431
00-06-1439	00-06-1440	00-06-1444	00-06-1445
00-07-0191	00-07-0193	00-07-0206	00-11-0171
00-11-0173 (KD)	00-11-0174 (KD)	00-15-0072	01-01-0678
01-01-0698	01-02-0301	01-02-0302	01-02-0303
01-02-0308 (KA)	01-02-0311 (KD)	01-02-0313	01-02-0316
01-02-0317	01-03-0485	01-04-1351	01-04-1361
01-04-1364	01-04-1367 (Ü)	01-04-1370 (Ü)	01-04-1372
01-04-1383	01-04-1385	01-04-1386	01-04-1389 (Ü)
01-04-1394	01-04-1395 (Ü)	01-04-1398 (Ü)	01-04-1408 (Ü)
01-04-1409	01-04-1414	01-04-1418	01-04-1419
01-04-1420	01-04-1422	01-04-1423	01-05-0400
01-05-0402	01-05-0405	01-05-0409	01-06-1448
01-06-1450	01-06-1465	01-06-1487	01-06-1517 (KA)
01-06-1519	01-06-1522	01-06-1532	01-07-0210
01-07-0216	01-11-0179 (KA)	01-14-0044	02-02-0331
02-02-0335 (I)	02-04-1434	02-04-1435	02-04-1436
02-04-1443 (Ü)	02-04-1445	02-04-1451	02-04-1453
02-04-1459	02-04-1467 (Ü)	02-04-1473	02-04-1476
02-04-1478	02-04-1481	02-04-1483 (Ü)	02-04-1484
02-04-1486	02-04-1488	02-04-1523	02-04-1528 (Ü)
02-04-1529	02-04-1532 (Ü)	02-04-1538	02-04-1544
02-04-1551	02-04-1554	02-05-0423	02-06-1540
02-06-1556	02-06-1566	02-06-1568	02-06-1595
02-07-0230	02-07-0231	02-07-0240	02-12-0113
03-04-1559	03-04-1564 (Ü)	03-04-1572 (Ü)	03-04-1574 (Ü)
03-04-1610	03-04-1613 (Ü)	03-04-1626 (KA)	03-04-1639
03-04-1640	03-04-1646	03-04-1654	03-04-1659
03-04-1664 (Ü)	03-04-1669	04-04-1700 (Ü)	04-04-1702 (Ü)
04-04-1737 (Ü)	04-04-1780 (Ü)	05-04-1937 (Ü)	84-04-0014
85-04-0022	85-04-0025	85-04-0028	85-06-0033
86-04-0034	86-04-0036	86-04-0039	86-04-0043
86-04-0048	86-04-0049	87-04-0053	87-04-0053
87-04-0056	87-04-0058	87-04-0059	87-04-0063
87-04-0066	87-04-0079	87-04-0082	87-04-0087
87-04-0088	87-04-0091	87-06-0092	87-06-0093
88-04-0092	88-04-0094	88-04-0101	88-04-0109

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

A. Anhang

88-04-0119	88-04-0122	88-04-0123	88-04-0123
88-04-0131	88-04-0132	88-04-0134	88-04-0137 (KA)
88-04-0138	88-04-0139	88-04-0142	88-04-0146
88-04-0148	88-04-0149	88-04-0152	88-06-0138
89-04-0154	89-04-0165	89-04-0173	89-04-0179
89-04-0186	89-04-0187	89-04-0188	89-04-0198
89-04-0207	89-04-0208	89-04-0211	89-04-0217
89-04-0218	89-04-0220	89-06-0179	90-01-0136
90-04-0227	90-04-0229	90-04-0231	90-04-0234
90-04-0235	90-04-0238	90-04-0242	90-04-0246
90-04-0253	90-04-0255 (KA)	90-04-0256	90-04-0264
90-04-0266	90-04-0268	90-04-0270	90-04-0272
90-04-0273	90-04-0278	90-04-0282	90-04-0291
90-04-0293	90-04-0295	90-04-0297	90-04-0300
90-04-0306	90-04-0310	90-04-0312	90-04-0315
90-04-0321	90-04-0325	90-04-0337	90-04-0338
90-06-0244	90-06-0249	90-07-0011	91-01-0159
91-03-0144	91-04-0347	91-04-0355	91-04-0378 (KA)
91-04-0388 (Ü)	91-04-0390	91-04-0391	91-04-0393
91-04-0395	91-04-0404	91-04-0405	91-04-0411
91-04-0415	91-04-0417	91-04-0418	91-06-0271
91-06-0277	91-06-0337	91-07-0016	91-07-0023
92-03-0179 (S)	92-03-0210	92-04-0427	92-04-0442
92-04-0443	92-04-0444 (KA)	92-04-0450	92-04-0453
92-04-0454	92-04-0457	92-04-0460	92-04-0462
92-04-0463	92-04-0467	92-04-0468	92-04-0469
92-04-0470	92-04-0471	92-04-0476	92-04-0479
92-04-0480 (Ü)	92-04-0484 (KA)	92-04-0486	92-04-0487
92-04-0489	92-04-0499	92-04-0501	92-04-0502
92-04-0503	92-04-0505	92-04-0508	92-04-0522
92-05-0175	92-06-0392	92-06-0395	92-06-0397
92-06-0399	92-06-0400	92-06-0413	92-06-0416
92-06-0418	93-01-0240	93-01-0253	93-02-0129
93-02-0131	93-02-0141	93-03-0245 (I)	93-04-0529
93-04-0530	93-04-0543	93-04-0553	93-04-0554
93-04-0558	93-04-0559	93-04-0560	93-04-0561
93-04-0563	93-04-0569	93-04-0570	93-04-0590

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

A. Anhang

93-04-0593	93-04-0596	93-04-0598	93-04-0605
93-04-0606	93-04-0607	93-04-0609	93-04-0615
93-04-0629	93-04-0632	93-04-0634	93-04-0641
93-04-0644	93-04-0646	93-04-0653	93-04-0655
93-04-0657	93-05-0195	93-05-0205	93-05-0220
93-05-0222	93-05-0225	93-05-0238	93-06-0482
93-06-0523	93-06-0532	93-06-0534	93-06-0535
93-06-0539	93-06-0543	93-06-0552	93-06-0554
93-06-0562	93-07-0049	94-01-0300 (KA)	94-01-0301
94-01-0302	94-01-0311	94-01-0319	94-01-0329
94-01-0330	94-01-0334	94-01-0341	94-02-0140
94-02-0148	94-02-0153	94-03-0282	94-03-0284
94-04-0659	94-04-0660	94-04-0664	94-04-0680
94-04-0681	94-04-0686	94-04-0687	94-04-0694
94-04-0695	94-04-0696	94-04-0697	94-05-0242
94-06-0565	94-06-0568	94-06-0572	94-06-0581
94-06-0587	94-06-0589	94-06-0592	94-06-0601 (KD)
94-06-0608	94-06-0609	94-06-0612	94-06-0616
94-06-0623	94-06-0640	94-06-0645	94-06-0648
94-06-0655	94-06-0657	94-07-0057	95-01-0349
95-01-0351	95-01-0352	95-01-0353	95-01-0358
95-01-0363	95-01-0365	95-01-0366	95-01-0375
95-02-0152	95-02-0154	95-02-0155	95-02-0162
95-03-0300	95-03-0309	95-03-0310	95-03-0312
95-03-0318	95-03-0320	95-03-0322	95-03-0324
95-04-0723	95-04-0727	95-04-0730	95-04-0733
95-04-0735	95-04-0740	95-04-0745	95-04-0746
95-04-0749	95-04-0753	95-04-0759	95-04-0760
95-04-0763	95-04-0766	95-04-0769	95-04-0780
95-04-0781	95-04-0786	95-04-0795	95-05-0260
95-06-0661	95-06-0662	95-06-0664	95-06-0667
95-06-0679	95-06-0685	95-06-0694	95-06-0699
95-06-0701	95-06-0707	95-06-0709	95-06-0711 (KD)
95-06-0725	95-06-0736	95-06-0740	95-06-0751
95-06-0758	95-07-0064	95-07-0066	95-07-0067
95-07-0069	95-07-0078	95-14-0006	95-15-0005
96-01-0384	96-01-0385	96-01-0389	96-01-0391

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

A. Anhang

96-01-0394	96-01-0397	96-01-0404	96-01-0414
96-01-0417	96-01-0420	96-01-0422	96-01-0429
96-01-0442	96-01-0444	96-02-0171 (I)	96-02-0173
96-02-0176	96-02-0188	96-03-0328	96-03-0330
96-03-0345	96-03-0346	96-03-0351	96-03-0352
96-03-0358	96-03-0363	96-03-0364	96-04-0801
96-04-0821	96-04-0847 (S)	96-04-0850	96-04-0854
96-04-0856	96-04-0857	96-04-0874	96-04-0881
96-04-0883	96-04-0885	96-04-0894	96-04-0902
96-04-0903	96-05-0270	96-05-0272	96-05-0275
96-06-0780	96-06-0781	96-06-0782	96-06-0784
96-06-0786	96-06-0789 (KD)	96-06-0795	96-06-0800
96-06-0818	96-06-0824 (KA)	96-06-0830	96-06-0835 (F)
96-06-0841	96-06-0842	96-06-0845	96-06-0847
96-06-0858	96-06-0859	96-06-0870	96-06-0872
96-06-0876	96-06-0879	96-06-0880 (KA)	96-06-0881
96-06-0892	96-07-0084	96-07-0087	96-07-0088
96-07-0090	96-07-0093	96-07-0096	96-07-0101
96-07-0103 (KA)	96-11-0124	96-11-0130	96-14-0011
96-14-0012	96-14-0013	96-14-0016	97-01-0447
97-01-0449	97-01-0458	97-01-0459	97-01-0463
97-01-0465	97-01-0467	97-01-0476	97-01-0478
97-01-0488	97-01-0499	97-02-0197	97-02-0198
97-02-0200	97-02-0201	97-02-0207	97-02-0208
97-03-0371	97-03-0383	97-03-0389	97-03-0394 (I)
97-03-0399 (KD)	97-03-0403	97-04-0910	97-04-0914
97-04-0917	97-04-0918	97-04-0919	97-04-0925
97-04-0927	97-04-0931	97-04-0934	97-04-0935
97-04-0939	97-04-0940	97-04-0943	97-04-0952
97-04-0958	97-04-0962	97-04-0968	97-04-0975
97-04-0977	97-04-0981	97-04-0995	97-04-0996 (KA)
97-04-0997 (KA)	97-04-0998 (KA)	97-04-0999	97-04-1002
97-04-1007	97-05-0280	97-05-0281	97-05-0282
97-05-0284	97-05-0289	97-05-0293	97-05-0297 (KD)
97-05-0298	97-06-0897	97-06-0901	97-06-0905
97-06-0909	97-06-0911 (KD)	97-06-0912	97-06-0930
97-06-0947	97-06-0954	97-06-0964	97-06-0966

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

A. Anhang

97-06-0970	97-06-0971	97-06-0975 (KA)	97-06-0977
97-06-0982	97-06-0991 (D)	97-06-0992	97-06-0994
97-06-0995	97-06-0998	97-06-1001	97-06-1005
97-06-1007	97-06-1009	97-06-1014	97-06-1015
97-06-1017	97-06-1024	97-06-1026	97-06-1037
97-07-0110 (S)	97-07-0114	97-07-0116	97-07-0126
97-11-0132	97-11-0143	97-14-0018	98-01-0505
98-01-0510 (KA)	98-01-0523	98-01-0528	98-01-0543
98-03-0412	98-03-0417	98-03-0421	98-03-0423
98-03-0427	98-03-0428	98-03-0429	98-04-1012
98-04-1024	98-04-1025	98-04-1026	98-04-1029
98-04-1031	98-04-1036	98-04-1041 (Ü)	98-04-1045
98-04-1046	98-04-1051	98-04-1054	98-04-1059
98-04-1072	98-04-1073	98-04-1076	98-04-1083
98-04-1085	98-04-1086	98-04-1093	98-04-1095
98-04-1102	98-04-1103	98-04-1105	98-04-1107
98-04-1108	98-04-1110	98-04-1111	98-05-0302
98-05-0303	98-05-0306	98-05-0309	98-05-0310
98-05-0311 (KD)	98-05-0314	98-05-0316	98-05-0317
98-05-0323	98-05-0329 (S)	98-06-1049	98-06-1066
98-06-1067	98-06-1079	98-06-1094	98-06-1108
98-06-1109	98-06-1116	98-06-1117	98-06-1118
98-06-1120	98-06-1122	98-06-1136	98-06-1139
98-06-1146	98-06-1147	98-06-1172 (I)	98-07-0136 (S)
98-07-0137	98-07-0139	98-07-0140 (S)	98-07-0141
98-07-0144	98-07-0145	98-07-0146	98-07-0153
98-07-0154	98-07-0159	98-11-0151	98-14-0020
98-14-0025	98-14-0028 (KA)	99-01-0560	99-01-0561
99-01-0562	99-01-0564	99-01-0568	99-01-0570 (I)
99-01-0580	99-01-0583	99-01-0585	99-01-0600 (KA)
99-02-0239	99-02-0247	99-02-0248	99-02-0251
99-03-0434	99-03-0435 (D)	99-03-0436	99-03-0438
99-03-0444	99-03-0446	99-03-0447	99-03-0448
99-03-0449	99-03-0452 (KA)	99-03-0453	99-04-1117
99-04-1120	99-04-1121	99-04-1122	99-04-1123
99-04-1125 (Ü)	99-04-1126	99-04-1127	99-04-1128 (S)
99-04-1130	99-04-1135	99-04-1139	99-04-1141

COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN IN DER TOXIKOLOGIE

A. Anhang

99-04-1142	99-04-1144 (Ü)	99-04-1151 (S)	99-04-1166
99-04-1171	99-04-1176	99-04-1177	99-04-1178
99-04-1181	99-04-1185 (Ü)	99-04-1188 (Ü)	99-04-1191 (Ü)
99-04-1194	99-04-1195 (Ü)	99-04-1196	99-04-1202
99-04-1203	99-04-1204	99-04-1207	99-04-1208
99-04-1211 (Ü)	99-04-1214	99-04-2111	99-05-0331 (KA)
99-05-0338 (S)	99-05-0345	99-05-0348	99-05-0349
99-05-0350	99-05-0352	99-05-0353	99-05-0357
99-06-1216	99-06-1219	99-06-1220	99-06-1222
99-06-1236	99-06-1247	99-06-1267	99-06-1270 (KA)
99-06-1274	99-06-1277	99-06-1278 (I)	99-06-1280
99-06-1281	99-06-1282	99-06-1283	99-06-1289
99-06-1297	99-06-1301	99-06-1305	99-06-1306
99-06-1316	99-07-0170	99-07-0177	99-07-0178
99-07-0179 (S)	99-07-0180 (S)	99-07-0181	99-07-0182 (S)
99-07-0183	99-07-0184	99-07-0188	99-08-0084
99-11-0167	99-11-0170	99-14-0029	99-14-0030
99-14-0032			

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Ursula Gundert-Remy und Herrn Professor Dr. Ralf Stahlmann für die Überlassung des Themas sowie für die Betreuung und Unterstützung bei der Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser von der Universität Potsdam, der mir die Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät ermöglicht und meine Betreuung übernommen hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Jan G. Hengstler vom Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund, der mir durch Finanzierung ebenfalls die Promotion ermöglicht hat.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Hans Mielke vom BfR in Berlin für Hilfestellungen beim Modellieren.

Desweiteren danke ich den Kollegen vom Fraunhofer ITEM in Hannover für ihre Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem meiner Kollegin Anna Sonnenburg, die mir bei chemischen Fragestellungen mit Ratschlägen zur Seite stand und mir in Diskussionen Anreize für neue Ideen gegeben hat.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Mutter für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Computergestützte Analysen in der Toxikologie - Anwendung von In-silico-
Modellen und Nutzen in der Risikobewertung*

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Berlin, den 28. September 2015

FALKO PARTOSCH