

Bedeutung der in vivo-Endpunkte des Draize-Testes bei der Entwicklung und Bewertung von in vitro-Testmethoden für Augenreizung/-korrosion

Dr. Martina Hermann

82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie

Advanced Course Toxicology

29. Februar 2016



Excellence is our Passion

Anwendungsbereiche von in vitro-Testmethoden für Augenreizung/-korrosion

- In verschiedenen regulatorischen Umfeldern wird die Verwendung von in vitro-Methoden zur Bewertung des augenreizenden/-ätzenden Potentials u.a. im Rahmen eines abgestuften Vorgehens gefordert, unter anderem:
 - Kosmetikverordnung
 - REACH-Verordnung (Regulation on Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)
 - CLP-Verordnung (Regulation on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures) z.B. zur Einstufung von Wasch- und Reinigungsmitteln, Bioziden, Pestiziden usw.



In vitro-Testmethoden für Augenreizung/-korrosion sind von zentraler Bedeutung bei der Sicherheitsbewertung von Stoffen und Produkten.





Neue Herausforderung CLP

Überblick generische Konzentrationsgrenzen DPD (alt) / CLP (neu)

Produkteinstufung

Einstufung Inhaltsstoff		Schwere Ätzwirkung	ätzend	Schwere Augenschädigung	augenreizend	hautreizend
	DPD	C, R35	C, R34	Xi, R41	Xi, R36	Xi, R38
	CLP	Skin Corr. 1A	Skin Corr. 1B/C	Eye Dam. 1	Eye Irrit. 2	Skin Irrit. 2
	C, R35	≥10%	≥5 <10%	≥5%	≥1 <5%	≥1 <5%
	Skin Corr. 1A	≥5%	na	≥3%	≥1 <3%	≥1 <5%
	C, R34	-	≥10%	≥10%	≥5 <10%	≥5 <10%
	Skin Corr. 1B/C	-	≥5%	≥3%	≥1 <3%	≥1 <5%
	Xi, R41	-	-	≥10%	≥5 <10%	-
	Eye Dam. 1	-	-	≥3%	≥1 <3%	-
	Xi, R36	-	-	-	≥20%	-
Eye Irrit. 2	-	-	-	≥10%	-	
Xi, R38	-	-	-	-	≥20%	
Skin Irrit. 2	-	-	-	-	≥10%	

Beispiel: Mischung mit einer R41 bzw. Eye Dam. 1 Substanz

Labelling of the preparation (DPD: 1999/45/EC)	Scale	Labelling of the mixture (GHS)
Triggering content, symbol, hazard indication, risk phrase	%	Triggering content, pictogram, SIGNAL WORD, Hazard statement
$\geq 10 \%$, „Irritant“ „Risk of serious damage to eyes.“ 	10 – 100	$\geq 3 \%$ DANGER , (Eye Cat. 1) „Causes serious eye damage“ 
≥ 5 to $< 10 \%$, „Irritant“ „Irritating to eyes“ 	5 – 10	
0 to $< 5 \%$: no labelling	3 – 5	
	1 – 3	≥ 1 to $< 3 \%$ WARNING (Eye Cat. 2) „Causes serious eye irritation“ 
	0 – 1	0 to $< 1 \%$: no labelling

Konsequenzen der CLP Verordnung

- Für den sicheren Umgang mit Produkten ist die korrekte Einstufung und Kennzeichnung unverzichtbar.
- Aufgrund der Absenkung der Generischen Konzentrationsgrenzwerte werden unter CLP sehr viel mehr Produkte eingestuft oder gekennzeichnet.
- Folge:
 - Die Einstufung und Kennzeichnung passt nicht mehr zu dem, was der Verbraucher kennt.
 - Die Warnwirkung der Kennzeichnung wird deutlich nachlassen, wirklich gefährliche Produkte werden nicht mehr erkannt.
 - Dies kann zu einem unsicheren Umgang mit den Produkten führen.
 - Endpunkt Augenreizung/-korrosion ist besonders kritisch, da für Konsumgüter in der Praxis besonders relevant.



ABER: In der CLP Verordnung wird mehr Gewicht auf Daten zum Produkt gelegt.

In vitro-OECD Testmethoden: schwere Augenschädigung

Zweck	Testmethode	Mögliche CLP Einstufung	Anwendbarkeit und Einschränkungen
Identifikation Augenätzung/ schwere Augenreizung	OECD TG 437 Bovine Cornea Opacity Permeability Test (BCOP)	Eye Dam. 1	Stoffe und Mischungen. Alkohole und Ketone: Risiko der Überschätzung des Reizpotentials. Feststoffe: Risiko der Unterschätzung.
	OECD TG 438 Isolated Chicken Eye test (ICE)	Eye Dam. 1	Stoffe und Mischungen. Alkohole: Risiko der Überschätzung des Reizpotentials. Feststoffe und Tenside: Risiko der Unterschätzung.
Negative Ergebnisse müssen durch weitere Tests bestätigt werden.	OECD TG 460 Fluorescein Leakage (FL)	Eye Dam. 1	Nur wasserlösliche Stoffe oder Mischungen, keine flüchtigen Stoffe, starke Säuren und Basen, Fixiermittel. Schwierig bei gefärbten oder viskosen Stoffen oder Mischungen. Falsch-Positiv-Rate 7% und Falsch-Negativ-Rate 56%.
	OECD TG 491 Short Time Exposure (STE)	Eye Dam. 1	Bisher hauptsächlich Stoffe mit einem Bestandteil geprüft, generell aber anwendbar auf Mischungen. Auch wasserunlösliche Stoffe können getestet werden. Testprinzip: MTT

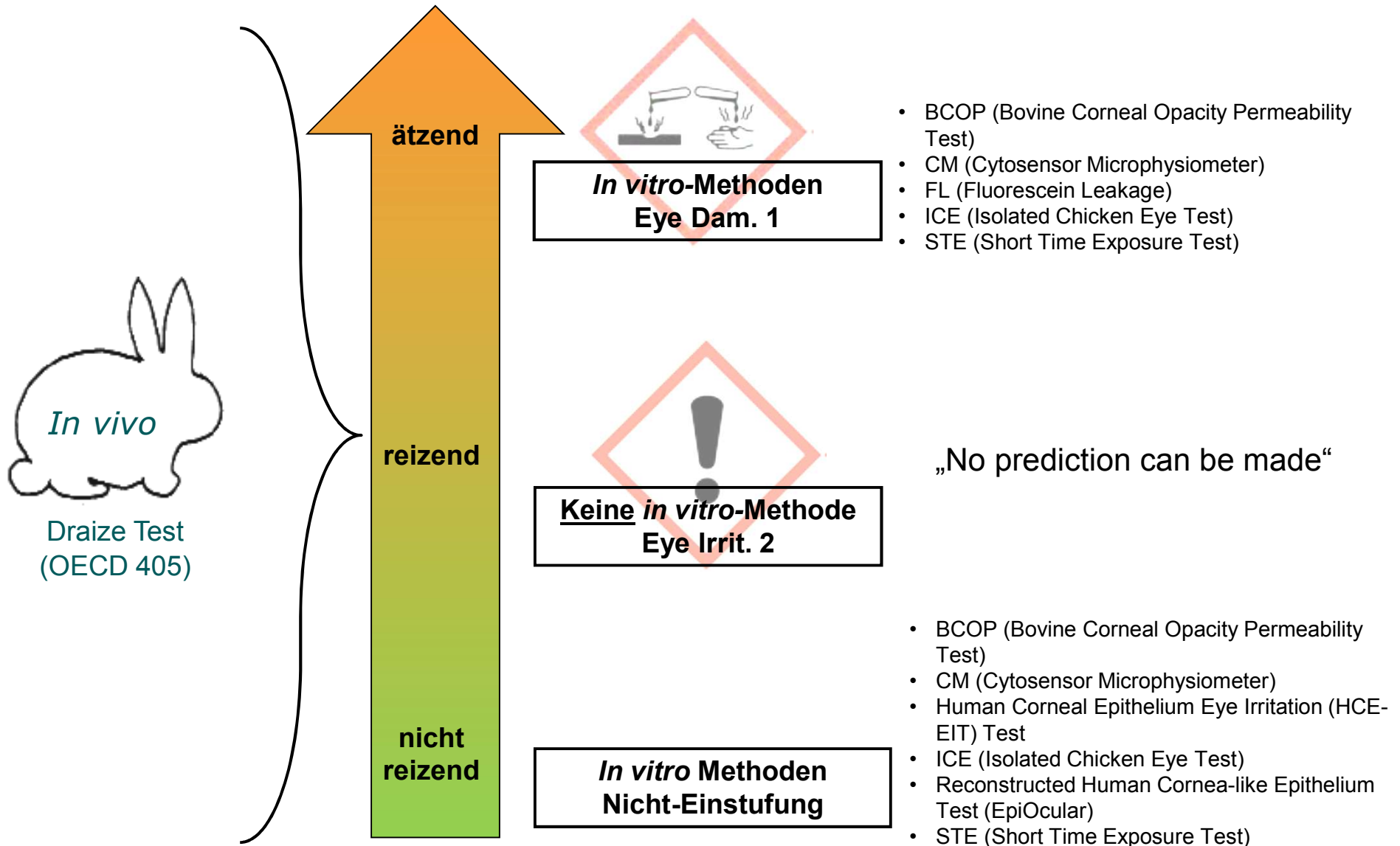
In vitro-OECD Testmethoden: Nicht-Einstufung

Zweck	Testmethode	Mögliche CLP Einstufung	Anwendbarkeit und Einschränkungen
Identifikation nicht einzustufender Stoffe	OECD TG 437 Bovine Cornea Opacity Permeability Test (BCOP)	Nicht eingestuft	s.o.
	OECD TG 438 Isolated Chicken Eye test (ICE)	Nicht eingestuft	s.o.
	OECD TG 491 Short Time Exposure (STE)	Nicht eingestuft	Nicht für flüchtige Stoffe (Dampfdruck > 6 kPa) oder Feststoffe außer Tenside geeignet.
Wenn nicht NC: Ergebnisse müssen durch weitere Tests bestätigt werden.	OECD TG 492 EpiOcular Eye Irritation Test (EIT)	Nicht eingestuft	<p>Identifizierung von Stoffen und Mischungen, die nicht als augenreizend oder -ätzend eingestuft werden müssen.</p> <p>Problematisch bei stark gefärbten oder reaktiven Stoffen durch Interferenz mit dem MTT-Zellviabilitätstest, dann MTT Bestimmung mittels HPLC/UPLC</p> <p>Cave: Testsubstanzen, die MTT reduzieren</p>

Kommende Draft in vitro-OECD Testmethoden

Zweck	Testmethode	Mögliche CLP Einstufung	Kommentar
Identifikation Augenätzung/ schwere Augenreizung	Cytosensor Microphysiometer (CM)	Eye Dam. 1	Nur für wasserlösliche Stoffe und Mischungen, die sich während der Messung nicht absetzen oder separieren. Hohe Falsch-Positiv-Rate und Falsch-Negativ-Rate.
Negative Ergebnisse müssen durch weitere Tests bestätigt werden.	Ocular Irritection Assay (OI)	Eye Dam. 1	Makromolekulares Reagenz mit einer Membran, das nach Rehydratation eine geordnete Struktur bildet. Testprinzip: Trübung durch Störung der Struktur.
Identifikation nicht einzustufender Stoffe Wenn nicht NC: Ergebnisse müssen durch weitere Tests bestätigt werden.	Cytosensor Microphysiometer (CM)	Nicht eingestuft	Wegen hoher Falsch-Negativ-Rate nur für die Einstufung von Tensiden und Tensid-haltigen Mischungen.
	Ocular Irritection Assay (OI)	Nicht eingestuft	s.o.
	Human Corneal Epithelium Eye Irritation (HCE-EIT) Test	Nicht eingestuft	Identifizierung von Stoffen und Mischungen, die nicht als augenreizend oder -ätzend eingestuft werden müssen. Zwei unterschiedliche Protokolle für Flüssig- oder Feststoffe. Basis: MTT-Zellviabilitätstest.

In vitro-Testmethoden Augenreizung/-korrosion



Worin liegt die Herausforderung?

Arch Toxicol (2014) 88:701–723
DOI 10.1007/s00204-013-1156-8

IN VITRO SYSTEMS

Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/ eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods

**Els Adriaens · João Barroso · Chantra Eskes · Sebastian Hoffmann ·
Pauline McNamee · Nathalie Alépée · Sandrine Bessou-Touya · Ann De Smedt ·
Bart De Wever · Uwe Pfannenbecker · Magalie Tailhardat · Valérie Zuang**

Received: 2 July 2013 / Accepted: 29 October 2013 / Published online: 28 December 2013
© The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

Einstufung des Draize-Testes nach EU CLP und UN GHS-Kriterien

Category 1					Category 2			
Severity (Mean scores of Days 1-3)		Persistence at Day 21			CO = 4	Severity (Mean scores of Days 1-3)		
CO ^{Maj} ≥ 3	IR ^{Maj} > 1.5	CO	IR	CR/CC		CO ^{Maj} ≥ 1	IR ^{Maj} ≥ 1	CR ^{Maj} and/or CC ^{Maj} ≥ 2
						Persistence at Day 7		
						CO	IR	CR/CC

Severity: Stärke der Verletzung; Persistence: Irreversibilität der Verletzung

CO: Corneal Opacity (Hornhauttrübung); IR: Iritis (Irisentzündung); CR: Conjunctival Redness (Bindehautrötung);
CC: Conjunctival Chemosis (Bindehautschwellung)

CO^{Maj}, IR^{Maj} und CR^{Maj}/CC^{Maj}: Mehrheit der Tiere (2 aus 3, 3 aus 4, 3 aus 5, 4 aus 6)

CO = 4: Cat. 1 bei Trübung 4 oder anderen schweren Effekten zu jeder Zeit während des Beobachtungszeitraums von 21 Tagen in jedem Gewebe und jedem Tier. Cat. 1 auch dann, wenn der Effekt nach 21 Tagen bereits rückgängig war (score > 0 in allen Geweben)

Retrospektive Analyse historischer Draize-Daten

Data source	Number of studies			UN GHS/EU CLP (valid studies)		
	Total	Excluded	Valid	No Cat	Cat 2	Cat 1
RCD	344	70	274	60.2	17.2	22.6
NCD	2319	459	1860	82.6	10.4	6.9

RCD: Reference Chemicals Databases (ECETOC, ZEBET, LNS)

NCD: European New Chemicals Database (ex-European Chemicals Bureau)

modifiziert nach Els Adriaens et al., Arch Toxicol 88: 701-723, 2014

“Drivers of classification” für Cat. 1 Einstufung

Effects	Severity %			Persistence only %	
	CO ^{Maj} ≥ 3	CO = 4* CO ^{Maj} < 3	IR ^{Maj} > 1.5	CO	No CO
RCD	32.3	29.0	3.2	25.8	9.7
Reversible	3.2	1.6	0.0		
Persistent	11.3	14.5	0.0		
Unknown	17.7	12.9	3.2		
NCD	24.0	7.0	3.9	52.7	12.4
Reversible	0.8	0.8	0.0		
Persistent	8.5	6.2	2.3		
Unknown	14.7	0.0	1.6		

*Irgendwann während des Beobachtungszeitraums von 21 Tagen

modifiziert nach Els Adriaens et al., Arch Toxicol 88: 701-723, 2014

Ungelöst: Abbildung von Persistenz in vitro

- Alle derzeit verfügbaren in vitro-OECD-Testmethoden können in der Regel Substanzen oder Mischungen erfassen, die aufgrund der **Schwere** der Effekte als Eye Dam. 1 eingestuft werden müssen.
- **ABER:** Keine der Methoden ist als solche geeignet auf Basis der **Persistenz** der Effekte Eye Dam. 1 Substanzen oder Mischungen zu erkennen.
- Folge: Keine ausreichende Differenzierung zwischen Eye Dam. 1 und Nicht-Eye Dam. 1.

Validierung von neuen in vitro-Methoden mit Draize-Daten

- Der Draize-Test ist die akzeptierte Referenzmethode zur Validierung von neuen alternativen Testmethoden.
- Die subjektive Bewertung der auftretenden Gewebeverletzungen am Auge führt zu einer hohen Variabilität der Draize-Ergebnisse, die damit oft nicht verlässlich und reproduzierbar sind.
- Substanzen ohne in vivo-Daten von guter Qualität sollten nicht als Referenzsubstanz in Validierungsstudien ausgewählt werden.
- Die Auswahl der Referenzsubstanzen sollte ausgewogen sein, sodass die relevanten in vivo-Endpunkte abgedeckt werden.

Lösungsansätze zur Bestimmung von Persistenz

Depth of Injury Model

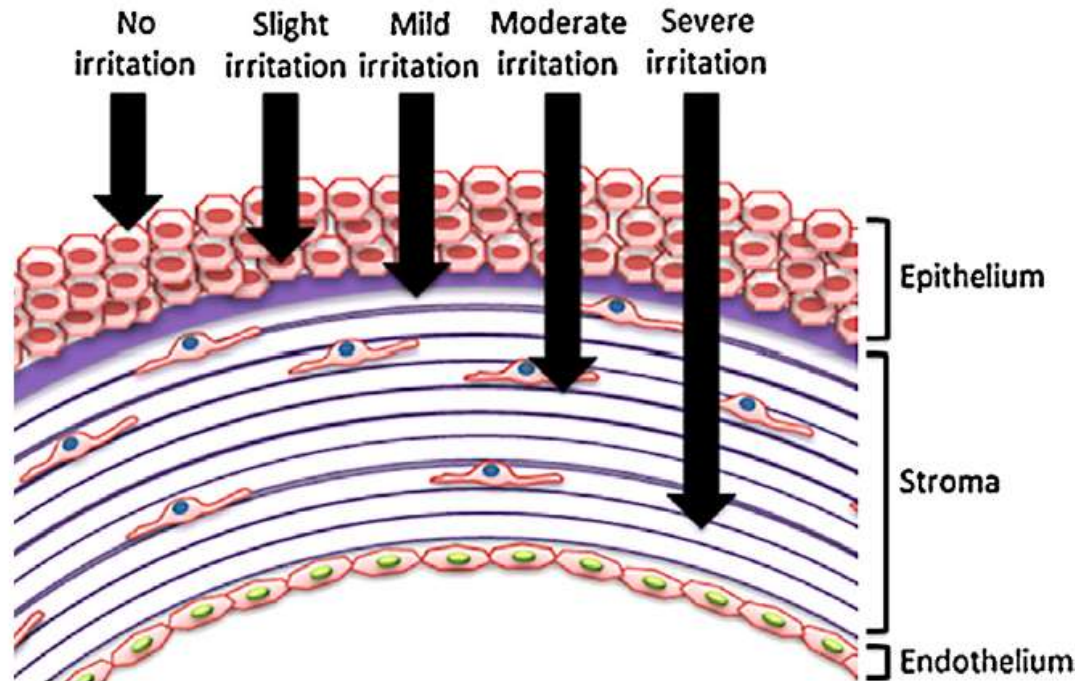


Abb. aus S.L. Wilson et al.,
Toxicology 327: 32–46, 2015

“regardless of the process leading to tissue damage, extent of initial injury is the principal, mechanistic factor determining the outcome of the ocular irritation”
Maurer et. al, Regulatory Toxicology and Pharmacology 36: 106–117, 2002

Beispiel: Isolated Chicken Eye Test mit Histopathologie

- Die Verwendung von Histopathologie ist bereits in der TG 438 aufgeführt, jedoch ohne Nennung von Kriterien zur Bewertung:
“users are encouraged to preserve eyes and prepare histopathology specimens that can be used to develop a database and decision criteria that may further improve the accuracy of this test method.”
- Im Rahmen des A.I.S.E. * *in vitro*-Testprogramms wurden Histopathologie-Kriterien für die Bewertung nicht-pH extremer Wasch- und Reinigungsmittel entwickelt.
- Histopathologie wird zur besseren Diskriminierung zwischen Eye Dam. 1 und Nicht-Eye Dam. 1 auf Basis der Persistenz der Effekte verwendet.
- Histopathologie wird nicht für pH-extreme Produkte benötigt, da hier die Einstufung mit Eye Dam. 1 über den Schweregrad der Effekte getriggert wird.
- Der Isolated Chicken Eye Test mit Histopathologie ist seit April 2015 auf dem Arbeitsplan der OECD.

*A.I.S.E.: Europäischer Waschmittelverband

Histopathologiekriterien für die Bewertung nicht pH-extremer Produkte

Handgeschirrspülmittel, Waschmittel und Allzweckreiniger

Verwendung zusammen mit dem validierten ICE Prädiktionsmodell

Gewebeschicht	Effekte, die zur Einstufung als Eye Dam. 1 führen
Epithel	<ul style="list-style-type: none">• Abtragung ≥ 2 (mäßig) in mindestens 2 von 3 Augen• und/oder, Vakuolisierung ($\geq \frac{1}{2}$, sehr leicht) im mittleren und/oder unteren Abschnitt des Epithels in mindestens 2 von 3 Augen• oder, falls Erosion ≥ 2 (mäßig) in 1 von 3 Augen + Vakuolisierung $\geq \frac{1}{2}$ (sehr leicht mittlerer und/oder unterer Abschnitt) in wenigstens einem weiteren Auge von 3 Augen• und/oder, Nekrose ≥ 2 (mäßig) in mindestens 2 von 3 Augen
Stroma	<ul style="list-style-type: none">• und/oder, pyknotische Kerne ≥ 1 (leicht) in mindestens 2 von 3 Augen
Endothel	<ul style="list-style-type: none">• und/oder, jeglicher Effekt in mindestens 2 von 3 Augen

Cazelle et al., Toxicology in Vitro 28: 657-666, 2014

Erkenntnisse

- In vitro-Testmethoden für Augenreizung/-korrosion sind von zentraler Bedeutung bei der Sicherheitsbewertung von Stoffen und Produkten.
- Seit 20 Jahren versuchen Wissenschaftler den in vivo-Draize Test durch in vitro-Alternativen zu ersetzen, bisher konnte nur eine teilweise Substitution erreicht werden.
- Gründe hierfür sind u.a.
 - das Fehlen von in vitro-Methoden zur Bestimmung persistenter Effekte in vivo
 - die Verwendung des in vivo-Draize-Testes als Referenzmethode
 - bestimmte EU CLP bzw. UN GHS Einstufungskriterien ohne biologische Relevanz
- Ein vielversprechender Ansatz ist z.B. der Isolated Chicken Eye Test mit Histopathologie

Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit