

---

# miljø og sundhed

Sundhedsstyrelsens Rådgivende Videnskabelige Udvalg for Miljø og Sundhed

Formidlingsblad 21. årgang, suppl. 1, juni 2015

---

## *Hvordan forudsiger vi kemikaliers toksicitet hos mennesker?*

### *Temannummer*

Hvordan ser fremtidens risikovurdering af kemikalier ud?

Miljøbetingede udsættelser i Danmark

Risikovurdering af kosmetiske produkter – hvor er der behov for ny viden?

Adverse Outcome Pathway (AOP) – et værktøj til beskyttelse af menneskers helbred

Føtal eksponering målt ved human placentaperfusion

Brug af alternative metoder til regulering af kemikalier – muligheder og begrænsninger

---

---

## Indhold

Hvordan ser fremtidens risikovurdering af kemikalier ud?..... 3

Miljøbetingede udsættelser i Danmark..... 8

Risikovurdering af kosmetiske produkter - hvor er der behov for ny viden? ..... 14

Adverse Outcome Pathway (AOP) - et værktøj til beskyttelse af menneskers helbred..... 17

Føtal eksponering målt ved human placentaperfusion ..... 23

Brug af alternative metoder til regulering af kemikalier - muligheder og begrænsninger ..... 30

## Miljø og sundhed

Bladet henvender sig primært til forskere, beslutningstagere og administratorer, der beskæftiger sig med miljø og sundhed.

## Udgives af:

Sundhedsstyrelsens Rådgivende Videnskabelige Udvalg for Miljø og Sundhed

## Redaktion:

Ulla Vogel (ansv)  
Tina Kold Jensen  
Hilde Balling

21. årgang, supplement nr.1, juni 2015.

Eftertryk mod kildeangivelse.

ISSN elektronisk 1601-4146  
<http://miljoogsundhed.sst.dk/blad/supp1501.pdf>

## Forord

Sundhedsstyrelsens Rådgivende Videnskabelige Udvalg for Miljø og Sundhed afholdt en velbesøgt temadag om hvordan vi forudsiger kemikaliers toksicitet hos mennesker den 15. april 2015 i Eigtveds Pakhus.

Baseret på indlæggene på temadagen er dette supplement til "miljø og sundhed" efterfølgende udarbejdet.

Temadag og temanummer er planlagt af en arbejdsgruppe under udvalget med følgende sammensætning:

Professor Lisbeth E. Knudsen, Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

Professor Anne Marie Vinggaard  
DTU Fødevareinstituttet

Professor Ulla Vogel  
Det Nationale Forskningscenter  
for Arbejdsmiljø

Læge Hilde Balling  
Sundhedsstyrelsen

Artiklerne er skrevet af temadagens foredragsholdere.

På udvalgets vegne retter jeg en stor tak til arbejdsgruppen og ikke mindst til de mange, der har bidraget til, at vi fik en fin dag i Eigtveds Pakhus og til udarbejdelsen af dette temanummer – et temanummer, der med fordel vil kunne anvendes som supplement til undervisningen på de relevante uddannelser.

Hilde Balling

---

---

# Hvordan ser fremtidens risikovurdering af kemikalier ud?

*Af Anne Marie Vinggaard, Camilla Taxvig, Anna Rosenmai, Marianne Dybdahl, Terje Svingen, Nikolaj Nikolov og Eva Bay Wedebye, DTU Fødevareinstituttet*

---

## Den brændende platform

Menneskeskabte kemikalier er blevet en integreret og uundgåelig del af det moderne samfund. De kan gøre livet mere bekvemt for mennesker, men de fremstilles og anvendes ikke uden konsekvenser. Mennesker bliver udsat for kemikalier fra mange kilder såsom vores fødevarer, kosmetik, tøj, elektronik, der kontaminerer vores indeluft, støv og drikkevand. Fra humane overvågningsundersøgelser ved vi, at mindst et par hundrede kemikalier kan detekteres i vores kroppe.

I de senere år er der fremkommet mere evidens for, at kemikalier har indvirkning på menneskers sundhed. I de seneste årtier har vi været vidne til en stigende forekomst af infertilitet (bla. dårlig sædkvalitet hos unge mænd), misdannede kønsorganer hos drengebørn, tidlig pubertetsudvikling og indlæringsvanskeligheder. Oprindelsen af de fleste af disse sygdomme menes at være opstået i fostertilværelsen. Genetiske ændringer kan blot forklare en mindre del af disse dysfunktioner, og det menes, at vores livsstil og miljøfaktorer, herunder udsættelse for kemikalier, er en af hovedårsagerne til denne udvikling. Meget tyder på, at eksponering for cocktails af kemikalier i fosterstadiet er en bidragende faktor til nogle af disse effekter på human sundhed.

Det anslås, at der i USA er omkring 83.000 kemikalier i brug, mens tallet for EU skønnes at være 40-60.000. Den store udfordring er, at vi har detaljeret information om sikkerhed og eksponering for maksimalt 800-1000 kemikalier. Dvs. vores mangel på viden er enorm for titusindvis af kemikalier, der er i brug i dag. Blandt de kemikalier, som vi mangler viden om, er for eksempel bromerede flamme-

hæmmere og fluorerede kemikalier, som vi ved ofte er svært nedbrydelige og ophobes i humant blod og væv. Hvis der i fremtiden opstår et problem med sikkerheden for nogle af disse kemikalier, vil det kunne give alvorlige problemer, da det tager mange år, før stofferne er ude af kroppen igen. Hvad gør vi ved alle de kemikalier, der mangler risikovurdering for?

## Det nuværende paradigme for risikovurdering af kemikalier

Det nuværende paradigme for risikovurdering af kemikalier indebærer, at primært dyr såsom gnavere anvendes til fareidentifikation. Det vil være nødvendigt også i fremtiden, da meget værdifuld information kan fås fra dyreforsøg. Der er derfor ikke tale om en karrikeret diskussion for eller imod brug af dyreforsøg. Men dyreforsøgene kan være et problem af flere årsager: For det første kan dyr ikke altid forudsige effekter på mennesker pga. forskelle i enten kinetik (absorption, fordeling, metabolisme og elimination) og/eller dynamik (effekt og virkningsmekanismer). Det er estimeret, at omtrent 50 % af human toksicitet kan forudsiges vha. gnavermodeller (1). For det andet er det ressourcekrævende at udføre dyreforsøg. Omkostningerne til tests inden for REACH er anslået til omkring 9,5 mia € i løbet af det næste årti, hvor dyreforsøg for reproduktionstoksicitet tegner sig for mere end 90 % af udgifterne (2). Dertil kommer, at de nuværende testkrav ofte ikke dækker vigtige endokrine effekter opstået under fostertilværelsen. Endelig er der politiske og etiske krav om at reducere dyreforbruget. Derfor er der mange gode grunde til at finde nye måder og til at optimere og forbedre måden, vi risikovurderer kemikalier på.

---

## Alternative løsninger for risikovurdering af kemikalier

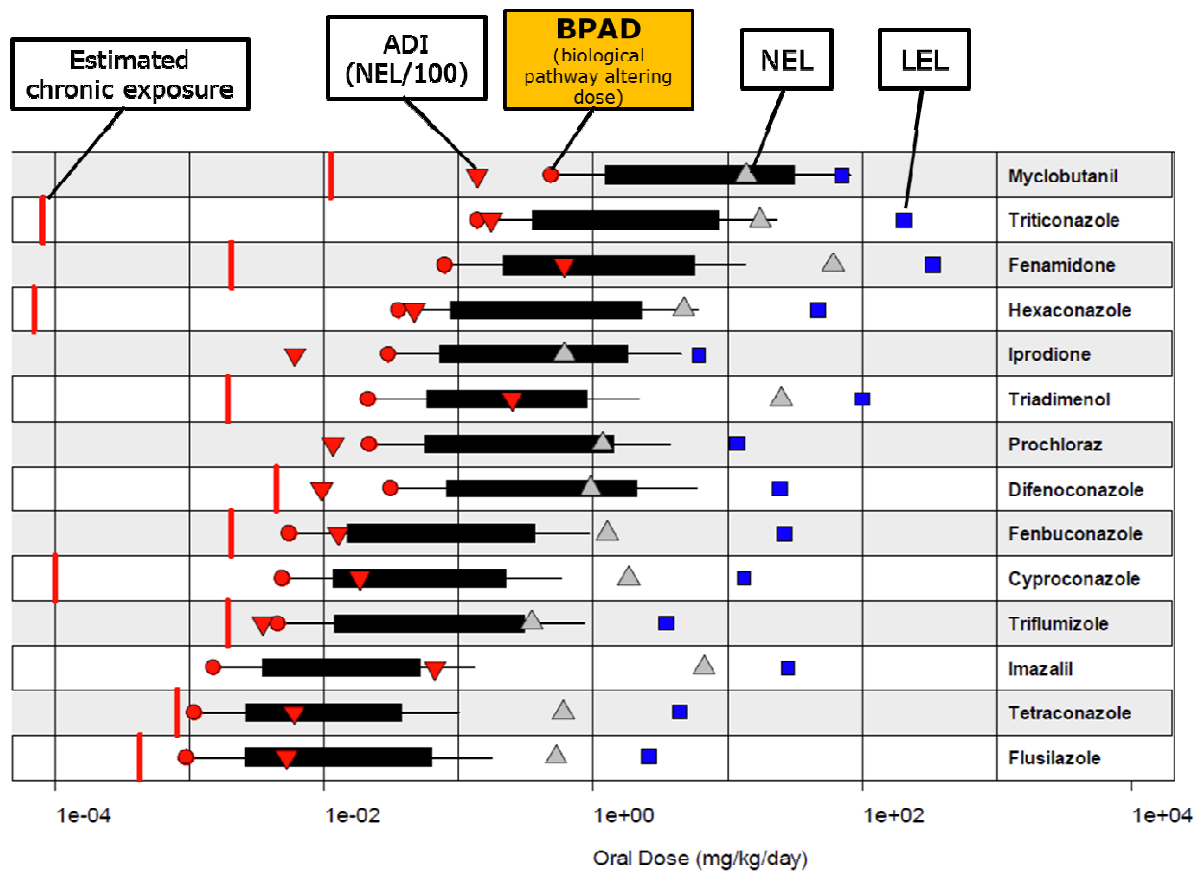
Men hvad gør vi? Findes der brugbare alternative løsninger? Vi vil hævde, at der på flere områder allerede gør det (f.eks. for toksicitet på hud og øjne), og at det er muligt at videreudvikle eksisterende eller udvikle nye løsninger inden for flere andre områder. Det giver håb om en mere bæredygtig fremtid på kemikalieområdet. Den alternative måde indebærer testning i et batteri af såkaldte *in vitro* metoder. Disse metoder vil typisk omfatte testning i humane celler og/eller væv af effektparametre (f.eks. binding til receptor eller ændret ekspresion af gener), der er relevante for den effekt, man vil undersøge for, f.eks. nedsat fertilitet. Her er det vigtigt, at de 'key events', der indgår i den såkaldte 'adverse outcome pathway' indgår i testbatteriet (se artikel om dette andetsteds i bladet). På baggrund af *in vitro* tests findes den koncentration af kemikalien, der kan forventes at ville forstyrre den humane organisme ('biological pathway altering concentration'). Dernæst er der brug for viden om toksikokinetikken, dvs. hvordan kroppen behandler kemikalien. Dette gøres vha. fysiologisk baseret kinetikmodellering (PBK modellering), der er ren computermodellering. Med sådanne modeller bliver kemikaliet absorption, fordeling, metabolisme og elimination (ADME) estimeret. Ved såkaldt 'omvendt dosimetri' kan menneskers indtag beregnes, dvs. den dosis eller det indtag under hvilket, det ikke forventes at ville føre til en kritisk effekt i mennesker (også kaldet en 'biological pathway altering dose'). Denne værdi kan anvendes ved risikovurdering af kemikalier og kan betragtes som et alternativ til ADI eller TDI (acceptabelt og tolerabelt dagligt indtag), der er beregnet på basis af NOAELs (no observed adverse effect levels) opnået i dyr. Det er vigtigt, at den alternative tilgang er baseret på humane testmetoder og humane PBK modeller, sådan at problemet med at ekstrapolere fra dyr til mennesker undgås.

### CASE 1: Toksicitet af conazolfungicider

I en undersøgelse fra US-EPA er 16 conazolfungicider undersøgt vha. den alternative til-

gang (3). Der blev anvendt humant baserede *in vitro* modeller for levertoksicitet og udviklet PBK modeller for de 16 stoffer. Værdier for 'biological pathway altering dose' (BPAD) blev sammenlignet med ADIer opnået på basis af dyreforsøg. Det er ikke optimalt at legitimere (eller validere) resultaterne ved sammenligning med dyreforsøgsdata pga. artsforskelle, men det er den eneste reelle mulighed, der er for at vurdere resultaterne og derfor bedre end ingenting. Der var generelt en rimelig overensstemmelse mellem resultaterne for de fleste stoffer, opnået på baggrund af de to metoder, dvs. at ADI og BPAD typisk lå inden for den samme størrelsesorden (figur 1).

På DTU Fødevarerinstitutionen har vi lavet grundige undersøgelser *in vitro* og *in vivo* (i dyr) af 5 udvalgte conazolfungicider, og et overblik over resultaterne er publiceret i Dreisig et al. (4). Et batteri af celletests for hormonforstyrrende effekter (vækst af humane brystkræftceller, androgen receptor antagonisme, arylhydrocarbon receptor agonisme, steroidhormonsyntese og effekter på aromatase) blev anvendt for at tegne den toksikologiske profil af stofferne. Dette blev fulgt op af omfattende dyreforsøg, hvor drægtige rotter blev eksponeret perinatalt, hvorefter reproduktionsrelaterede effektparametre blev undersøgt i det hanlige og hunlige afkom. Det viste sig, at alene på baggrund af farekarakteriseringen *in vitro* kunne vi opnå den samme rangering af fungiciderne, som der blev opnået *in vivo*. F.eks. var prochloraz og ketoconazol de to mest potente hormonforstyrrende stoffer både *in vivo* og *in vitro*. De udviste begge de mest markante effekter på det hanlige afkom *in vivo* og på de antiandrogene parametre *in vitro*. Omvendt viste epoxiconazol sig at forårsage markant reduktion i estradiolniveauer både *in vitro* og *in vivo* i hunnerne, og det var sandsynligvis årsagen til den markante fosterskadende effekt. Mere detaljeret information kan findes i Dreisig et al. (4). Sådanne typer af data, kombineret med en PBK modellering, kan man forvente vil kunne bidrage til en alternativ risikovurdering i fremtiden.

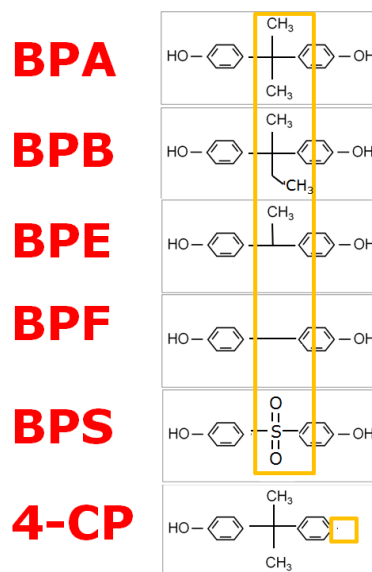


Figur 1. 'Biological pathway altering doses' for 16 conazol fungicider bestemt ved en kombineret *in vitro*-PBK modelleringstilgang og sammenlignet med levertoksicitetsdata fra gnavere. LEL: low effect level; NEL: no effect level; ADI: acceptable daily intake. Modified from Judson et al. 2011 (3).

## CASE 2: Alternativer til bisphenol A

Bisphenol A (BPA) bliver i stigende grad erstattet med alternative bisphenoler pga. dets hormonforstyrrende egenskaber. Problemet er, at alternativer endnu ikke er tilstrækkeligt undersøgt. Vi har lavet en toksikologisk profilering *in vitro* af 4 bisphenoler (B, E, F & S) og 4-cumylphenol (figur 2). Disse data sammen med andre af vores upublicerede data for effekter på adipocytdifferentiering viser, at stofferne har kvalitativt den samme toksikologiske profil med ganske få undtagelser (figur 3). De er alle ER agonister, AR antagonister, hæmmer androgensyntese, forøger progesteronsyntese og estrogensyntese (sidstnævnte

med undtagelse af BPS) (5). Disse *in vitro* data blev understøttet af en QSAR modellering, som også forudsiger lighed i effekter. For bisphenol A findes en overvældende mængde information mht. toksikologiske effekter og eksponering baseret på baggrund af årtiers forskning. Når vi i denne situation står med noget, vi kunne kalde et referencekemikalie som bisphenol A, der er undersøgt meget grundigt i talrige dyreforsøg, burde sådanne *in vitro* data sammen med PBK modelleringsdata kunne danne et tilstrækkeligt grundlag for en risikovurdering af disse alternativer.



Figur 2. Den kemiske struktur af bisphenol A, B, E, F, S, hvis struktur afviger mht. den bro, der forbinder phenolringene, og 4-cumylphenol, der afviger ved at mangle en hydroxygruppe på den ene phenolring.

	ER	AR	Steroid hormone synthesis				AhR	PPAR $\alpha$	PPAR $\gamma$	RAR	Nrf2	p53
			Prog	Corticoids	Androgens	Estrogens						
<b>BPA</b>	↑	↓	↑	↓	↓	↑						↑
<b>BPB</b>	↑	↓	↑	↓	↓	↑						↑
<b>BPE</b>	↑	↓	↑	↑	↓	↑		↑				↑
<b>BPF</b>	↑	↓	↑	↑	↓	↑		↑		↑		
<b>BPS</b>	↑	↓	↑	↓	↓			↑				
<b>CP</b>	↑	↓	↑	↓	↓	↑						

Figur 3. Bisphenol A, B, E, F, S og 4-cumylphenol er toksikologisk profilerede i et batteri af *in vitro* tests bestående af reporter gen assays for estrogenreceptoren (ER), androgenreceptoren (AR), arylhydrocarbonreceptoren (AhR), PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , retinoidreceptoren (RAR), Nrf2 som indikator for oxidativt stress, p53 som indikator for effekter på DNA repair. Endelig inkluderet en test for effekter på syntesen af progestagener (prog), corticosteroider, androgener og estrogener. Rød: Aktivering; Grøn: Hæmning; Grå: Ingen effekt.

---

## QSAR modeller

I de tilfælde, hvor der ikke findes nogen eksperimentelle data for kemikalier, er det ofte muligt at forudsige toksiciteten. Ved anvendelse af computerbaserede 'Quantitative Structure Activity Relationships' (QSARs) har vi mulighed for at forudsige farer ved kemikalier på basis af viden om kemiske strukturer. Vi råder over ca. 150 modeller til forudsigelse af diverse toksiciteter, herunder flere modeller for human toksicitet. De humane modeller er baserede på data fra kliniske forsøg for lægemidler. Den enkelte (Q)SAR model har typisk en nøjagtighed på 75-90 % i forhold til de eksperimentelle data, som man skal huske ikke altid er 100 % reproducerbare eller nøjagtige. Hvis man kombinerer flere forskellige QSAR systemer (f.eks. tre) kan nøjagtigheden forbedres udover nøjagtigheden af de individuelle metoder. Dette kan sammenlignes med, at man spørger tre forskellige eksperter om deres vurderinger af de samme datasæt. Sådanne værktøjer er værdifulde for kemikere, der skal syntetisere nye kemikalier og lægemidler, kosmetik eller industrikemikalier, og for de regulerende myndigheder, der skal godkende nye industrikemikalier, pesticider eller lægemidler, og værktøjerne bør derfor anvendes i højere grad. Miljøstyrelsen i Danmark stod oprindeligt bag etableringen af denne aktivitet og har gennem mange år anvendt QSAR modellering. Derudover har DTU Fødevarer-instituttet for nylig opstartet et spin-out firma, Saxocon ([www.saxocon.com](http://www.saxocon.com)) der leverer QSAR ekspertise til pharmabranchen.

## Konklusion

Det beskrevne perspektiv for fremtidens risikovurdering omfatter brug af flere komplementære metoder, der inkluderer humane *in vitro* og/eller vævstests, computermodeller dels til at beskrive ADME forhold og dels til at forudsige toksiciteter på baggrund af kemisk struktur, og endelig 'Adverse Outcome Pathways' (se artikel af Marianne Dybdahl) og integrerede teststrategier, der munder ud i en holistisk analyse af alle data. Perspektivet skitserer en ramme for anvendelse af data uden brug af dyr

til at estimere acceptable humane indtag af kemikalier. Vi forudsiger, at sådanne nye tilgange vil blive afgørende i forhold til at udvikle en mere bæredygtig måde at risikovurdere kemikalier på i fremtiden.

Yderligere information:

Anne Marie Vinggaard

[annv@food.dtu.dk](mailto:annv@food.dtu.dk)

## Referencer

1. Olson H et al. *Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals*. Regul Toxicol Pharmacol 2000;32:56-67.
2. Hartung T, Rovida C. *Chemical regulators have overreached*. Nature 2009;460:1080-1.
3. Judson RS, Kavlock RJ, Setzer RW, Hubal EAC, Martin MT, Knudsen TB, Houck KA, Thomas RS, Wetmore BA, Dix DJ. *Estimating Toxicity-Related Biological Pathway Altering Doses for High-Throughput Chemical Risk Assessment*. Chem Res Toxicol 2011;24:451-62.
4. Dreisig K, Taxvig C, Kjærstad MB, Nellemann C, Hass U, Vinggaard AM. *In vitro-in vivo correlations for developmental toxicity and endocrine disrupting effects of conazole fungicides*. ALTEX 2013;30:319.
5. Rosenmai AK, Dybdahl M, Pedersen M, van Vugt-Lussenburg B, Wedeby EB, Taxvig C, Vinggaard AM. *Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives?* Tox Sci 2014; 139(1):35-47.
6. *Fifth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. 2014, Dep. of Health and Human Serv. Centers for Disease Cont. and Prev., US.



---

## Miljøbetingede udsættelser i Danmark

Af Lisbeth E. Knudsen og Thit Aarøe Mørck, Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

---

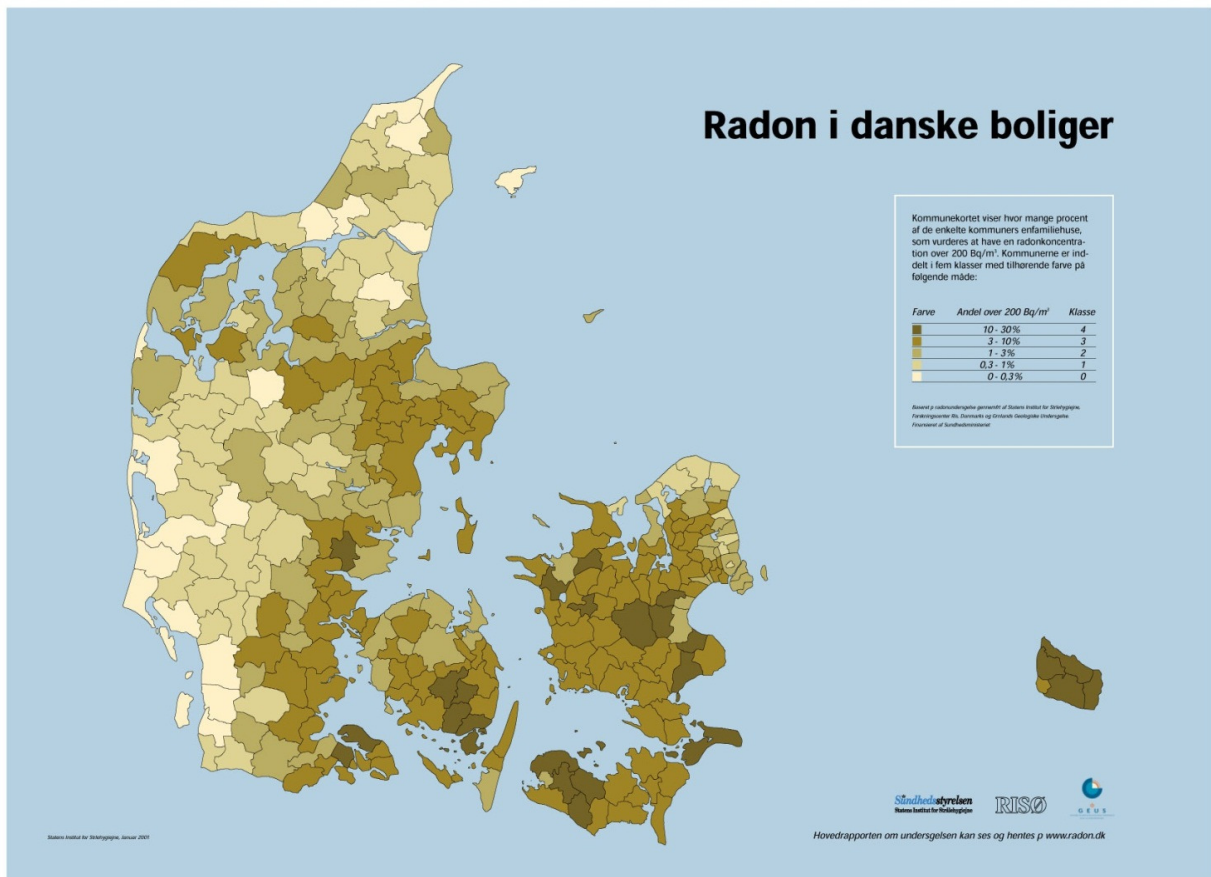
Sundhedsstyrelsens temadag d. 15. april 2015 omhandlede brug af nyere toksikologiske metoder som værktøj til risikovurdering, og i denne sammenhæng er det væsentligt at se på hvilke stoffer, vi i Danmark udsættes for, således at risikovurderingen rettes mod aktuelle og kommende problemstillinger. Vi bliver hele tiden udsat for påvirkninger fra miljøet, for eksempel gennem luft, jord, vand, fødevarer og ved brug af diverse produkter. Miljøet indvirker på sundheden overalt, hvor vi befinder os, indendørs og udendørs, i boliger, institutioner, skoler, på arbejdspladser, og i transportmidler.

Sundhedsstyrelsen har i publikationen Kemikalier og helbred fra 2012 opsummeret kilder til kemiske stoffer og deres effekter i nedenstående tabel, hvor eksponeringer fra udeluft (udstødningsgasser og industriforurening) anses for én af de væsentligste kilder. Stoffer i jord, grund og drikkevand har været i fokus, og her er det især tungmetaller og pesticider, opmærksomheden er rettet mod. I indeklimaet findes en række afgangskemikalier (radon, VOC, phthalater) og kemikalier fra forbrugerprodukter som persistente forbindelser mm. (tabel 1).

Tabel 1: Eksempler på kilder til kemiske stoffer og deres effekter (reproduceret fra (1))

Kilder	Kemiske stoffer/stofgrupper	Potentielle effekter forbundet med stofferne (ikke udtømmende)
Udeluft	Stoffer og partikler fra udstødningsgas fra biler, industrielle emissioner og forbrænding (f.eks. brændeovne): partikler, SO <sub>2</sub> , NO <sub>x</sub> , ozon, bly, dioxin, benzen, PAH'er	Luftvejseffekter, hjerte- og karlidelser, udviklingseffekter, kræft
Grund- og drikkevand	Pesticider, herbicider, gødningsstoffer, nitrat, metaller, opløsningsmidler, fluorid, petroleumsprodukter, biprodukter fra desinfektion (klorerede forbindelser)	Hormonforstyrrende effekter, reproduktionstoksiske effekter, nerveskadende effekter, allergi og eksem
Jord	Tungmetaller, PCB og andre persistente organiske stoffer, pesticider, klorerede opløsningsmidler	Nerveskadende effekter, hormonforstyrrende effekter, reproduktionstoksiske effekter, allergi og eksem, kræft
Indeklima	Ftalater, formaldehyd, organiske opløsningsmidler, polybromerede flammehæmmere, SO <sub>x</sub> , NO <sub>x</sub> , CO, Radon, asbest, PCB, partikler fra brændeovne	Nerveskadende effekter, hormonforstyrrende effekter, reproduktionstoksiske effekter, allergi og eksem, kræft, luftvejsproblemer, hjerte- og kar lidelser
Fødevarer og fødevareremballager	Pesticider, tungmetaller, aflatoxiner, dioxiner, acrylamid, polyfluorerede stoffer (PFC)	Hormonforstyrrende effekter, reproduktionstoksiske effekter, allergi og eksem, kræft
Forbrugerprodukter	Tungmetaller, pesticider, persistente organiske stoffer, formaldehyd, ftalater, konserveringsmidler som parabener, parfumestoffer, farvestoffer, nanosølv, opløsningsmidler	Hormonforstyrrende effekter, reproduktionstoksiske effekter, allergi og eksem, kræft, effekter på luftveje og nervesystemet

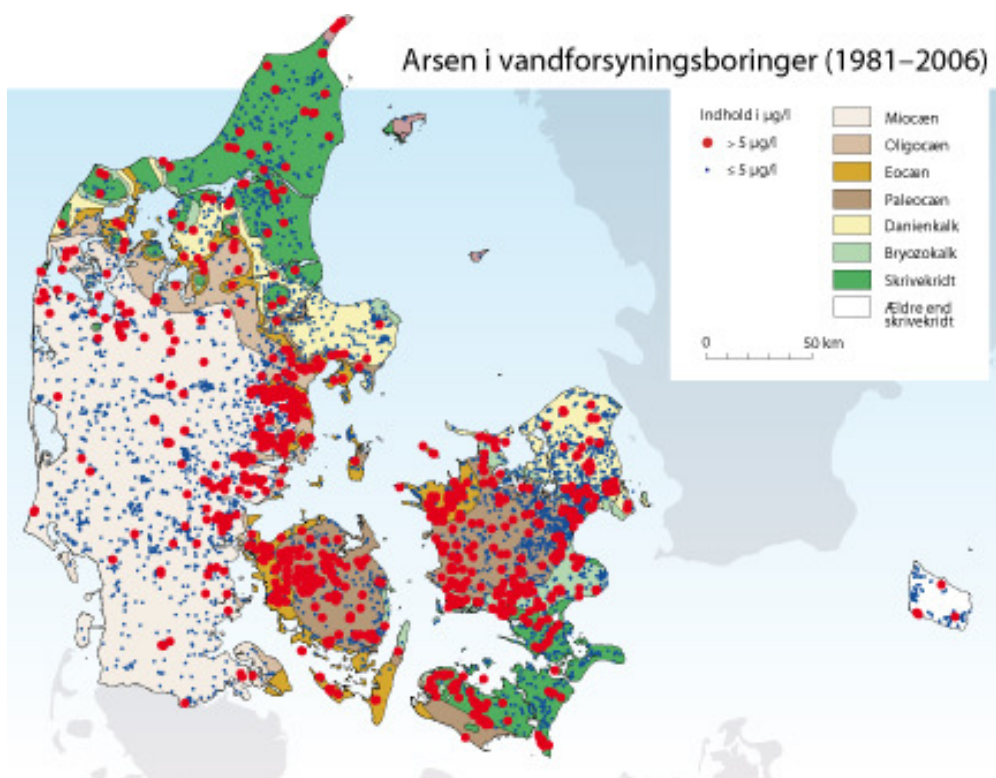




Figur 1. Radon i boliger 2001 (gengivet med tilladelse fra (2))

Graden af udsættelse vil afhænge af en lang række faktorer, som afhænger af kilderne til de kemiske stoffer i miljøet, og disse kortlægges ved målinger af koncentrationer i miljø, produkt eller i nogle tilfælde kilden. Eksempler herpå er radonudsættelse, som følger de geologiske strukturer. Målinger fra 2001 i danske boliger er gengivet i kortet i figur 1. Som det ses på kortet, er det ikke kun Bornholm med granitundergrund, der har udslip af radon til boliger. Også kvaliteten af drikkevand følger geologiske strukturer, og her er der fokus på arsen, som i kortet fra De Nationale Geologiske Undersøgelser for Danmark og Grønland (figur 2) viser niveauer over 5 µg/l nogle steder i landet.

Fødevarer og fødevareremballage anses for at være en væsentlig kilde til udsættelse for kemikalier, som det fremgår af Fødevarerstyrelsens hjemmeside, hvor man under "Guides - Fødevarerstyrelsen" kan finde nærmere beskrivelser samt råd til at undgå en række kemikalier i fødevarer og emballage (4).



Figur 2. Indholdet af arsen i grundvandet i Danmark i forhold til udbredelsen af prækvartære formationer. Røde prikker angiver, hvor koncentrationer i grundvandet er over 5  $\mu\text{g/l}$ , mens blå prikker viser, hvor koncentrationer i grundvandet er under 5  $\mu\text{g/l}$ . 5  $\mu\text{g/l}$  er grænseværdien for arsenen ved afgang fra vandværk. Gengivet med tilladelse fra (3).

Overskrifter på de forskellige råd og retningslinjer, der er at finde på Fødevarestyrelsens hjemmeside, ses nedenstående.

Vær opmærksom på bisphenol A fra plast og dåser  
 Sådan undgår du fluorerede stoffer fra emballage  
 Vær opmærksom på nitrit  
 Er der ftalater i emballage?  
 Vær opmærksom på furan i kaffe og færdigmad  
 Sådan begrænser du akrylamid fra kartofler, korn og kaffe  
 Sådan undgår du tjærestoffer (PAH) i din mad  
 Sådan får du færre pesticidrester i dine fødevarer  
 Sådan begrænser du nitratholdige grøntsager til spædbørn  
 Sådan undgår du svampegiftstoffer fra fødevarer  
 Kend dit sødestof  
 Vær opmærksom, når du plukker vilde planter og svampe  
 Sådan tilbereder du frugt og grønt - undgå naturens egne giftstoffer  
 Vær opmærksom på visse krydderier, krydderurter, rødder og frø  
 Vær opmærksom på uorganisk arsen i risprodukter

---

Undgå vokarter fra escolar og oliefisk/smørmakrel  
Sådan begrænser du dit indtag af dioxin  
Vær opmærksom, når du samler muslinger og østers  
Sådan begrænser du dit indtag af kviksølv fra fisk  
Sådan begrænser du dit indtag af bly  
Vær opmærksom på cadmium i solsikkefrø, hørfrø, skaldyr, chokolade og kakao  
Sådan afkoder du, hvad der ligger bag GMO  
Sådan afkoder du, hvad der ligger bag E-numre  
Jul med mindre kemi  
Indpakning  
Hvilken emballage må bruges til hvilke fødevarer?  
Sådan behandler du mugne fødevarer  
Hvorfor vælge økologi?  
Fastfood med mindre uønsket kemi  
Gravid med mindre uønsket kemi  
Hvad er der kommet i min vin?  
Sådan får du mindre uønsket kemi fra mad fra havet  
Spæd- og småbørns mad med mindre uønsket kemi  
Værd at vide om æg  
Værd at vide om medicinrester i eksotiske fisk og skaldyr

## Human biomonitoring

For at gennemføre en risikovurdering er det nødvendigt at vide, hvor meget vi reelt bliver udsat for af de forskellige kemikalier. Til undersøgelse af dette kan man benytte sig af human biomonitoring (HBM), der netop er en metode til at måle niveauet af forskellige biomarkører for blandt andet kemikalier direkte i matrix fra mennesker. Dette gøres blandt andet ved at måle på urinudskillelsen af f.eks. ftalater, eller analysere en blodprøve for indholdet af kemikalier.

Danmark har for nyligt deltaget i et større europæisk projekt, DEMOCOPHES, om HBM i 17 EU lande. I den danske del af DEMOCOPHES blev eksponeringen for 65 forskellige biomarkører undersøgt i en gruppe af danske skolebørn i alderen 6-11 år og deres mødre fra land- og byområder (5). Den miljømæssige eksponering for kemikalier fra en række forskellige kilder, herunder fødevarer, plast, elektronik, kosmetik og bolig, blev målt til en estimering af eksponeringen i danske børn og kvinder. Blodprøver blev analyseret for 9 polychlorerede biphenyler (PCB), 4 dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) metabo-

litter, hexachlorbenzen (HCB),  $\beta$ -hexachlorcyclohexan  $\beta$ -HCH, 6 polyfluoralkylstoffer (PFAS) og 7 polybromerede diphenyler (PBDE). Blodprøverne blev desuden analyseret for dioxin-lignende aktivitet og en biomarkør for effekt, mikrokernefrekvens. Hårprøver blev analyseret for indhold af kviksølv. Urinprøver blev analyseret for 15 ftalatmetabolitter, 7 parabener og 9 phenoler samt cadmium, kotinin og paracetamol.

Resultaterne viste, at kun tre biomarkører ikke kunne påvises i nogen af deltagerne. Tre og tyve biomarkører blev fundet i alle mødre og 22 blev fundet i alle børn. Undersøgelsen viste, at der var en signifikant sammenhæng mellem indtaget af fisk og kviksølvkoncentrationen i hår, og at koncentrationen af de persistente stoffer var signifikant associeret med mødrenes alder. En negativ association blev fundet mellem body mass index (BMI) og PCB koncentrationer i plasma, især hos børnene. Mødre med 3 eller flere børn havde et signifikant lavere plasmaniveau af perfluorerede stoffer sammenlignet med mødre med kun et eller to børn, hvilket indikerer paritet som en vigtig faktor for niveauet af PFAS i plasma. De fleste af de målte PCB kongener, dioxin-lignende

---

aktivitet og kviksølv i hår samt flere parabener og phenoler var højere i mor-barn par fra byen sammenlignet med par fra landområdet.

Desuden viste undersøgelsen, at mange af biomarkørerne fulgte det samme eksponeringsmønster i børnene og deres mødre. Men forskelle i niveauer hos mødre og børn blev også fundet, hvilket kan skyldes forskelle i toksikokinetik, bioakkumulering samt forskelle i eksponeringskilder. Der blev også fundet statistisk signifikante sammenhænge imellem de målte koncentrationer i både den persistente og den ikke-persistente gruppe kemikalier, hvilket indikerer fælles eksponeringskilder og -mønstre inden for de forskellige grupper af kemikalier. PCB kongenererne, de perfluorerede stoffer samt kviksølvkoncentrationerne i hår var positivt korreleret med hinanden, hvilket peger på, at man muligvis kan benytte enkelte biomarkører som proxy-markører for den samlede eksponering for persistente stoffer. Ingen association blev fundet mellem biomarkøren for effekt, mikrokernefrekvens, og biomarkørerne for eksponering. Samlet set kunne det konkluderes ud fra DEMOCOPHES undersøgelsen i Danmark, at eksponering for kemikalier i de danske deltagere er allestedsnærværende. Bestemte faktorer såsom alder, BMI og paritet kan have indvirkning på plasmakoncentrationen af de målte blodbiomarkører. Eksponeringen synes at følge et familierelateret mønster, og især kemikalier fra samme gruppe er signifikant korreleret med hinanden. Det er væsentligt at pege på, at med denne eksponering for mange kemikalier samtidig, hvoraf mange er hormonforstyrrende, kan der være en risiko for skadelige effekter i den danske befolkning, muligvis med højere risiko for beboere i byen. Da nogle af biomarkørerne blev målt i højere niveauer hos børn sammenlignet med mødre, er der desuden behov for øget fokus på eksponering hos børn. Studiet giver anledning til flere fremtidige studier om den mulige korrelation mellem de forskellige biomarkører for eksponering. Flere studier med flere deltagere samt en mere specifik spørgeskemaundersøgelse er nødvendig for at undersøge specifikke kilder til

eksponering nærmere (6,7). DEMOCOPHES er i Danmark gennemført med supplerende finansiering fra Miljø-, Fødevarer- og Sundhedsstyrelserne, og de kemiske analyser er udført på Syddansk Universitet og Rigshospitalet.

Vi har på Københavns Universitet bidraget til en rapport til det europæiske fødevareragentur (EFSA) om brug af HBM i forhold til bedømmelse af eksponeringer fra fødevarer (8), hvor det anbefales at medtage data fra HBM i risikovurdering af udsættelser i fødevarer. Hidtil har risikovurderingerne været baseret på eksponeringsdata fra analyser af fødevarer og oplysninger om indtag fra spørgeskemaer. Der findes ganske mange europæiske studier med HBM, men egentlige overvågningsprogrammer er kun gennemført i Tyskland.

EU-kommissionens mange direktorater med interesse inden for miljø, sundhed, handel, forskning m.m. ønsker en struktur inden for EU, som muliggør mere harmoniseret brug og fortolkning af HBM data. Initiativet har form af en forskningsaktivitet under Horizon 2020 Personalized Medicine topic 4 – 2016 - The European Human Biomonitoring Initiative [RTD]. Kommissionen har nedsat en stor arbejdsgruppe med repræsentanter fra alle EU lande (samt Norge, Island og Schweiz), der bidrager til beskrivelse af en struktur, som landene kan anbefale. Fra Danmark deltager Anna-Maria Andersson fra Rigshospitalet og Lisbeth E. Knudsen fra Københavns Universitet som eksperter, udpeget af Forskningsstyrelsen. Der forudsættes national medvirken og koordinering med de relevante myndigheder og alle nationale interessenter i en national HUB, som skal dannes. Arbejds miljø ønskes inddraget, og de relevante ministerier fremgår af nedenstående tabel 2, idet også Forskningsministeriet forventes at medvirke.

---

Tabel 2: Kilder til eksponering for kemiske stoffer og myndighedsansvar (reproduceret efter (1))

Kilder til eksponering	Myndighedsansvar
Miljø (luft, jord- og vandforurening)	Miljøstyrelsen/Naturstyrelsen
Arbejds miljø, herunder indeklima på arbejdspladsen	Arbejdstilsynet
Fødevarer	Fødevarestyrelsen
Forbrugerprodukter og kemiske stoffer og blandinger	Miljøstyrelsen
Indeklima, byggevarer	Miljøstyrelsen (Energistyrelsen)

Yderligere information:

Lisbeth E. Knudsen

[liek@sund.ku.dk](mailto:liek@sund.ku.dk)

## Referencer

1. Kemikalier og helbredseffekter - informationsmateriale til sundhedspersonale, Sundhedsstyrelsen 2012. <http://sundhedsstyrelsen.dk/publ/Publ2012/12dec/KemiOgHelbred.pdf>
2. <http://sundhedsstyrelsen.dk/sis>, se under radon/boliger.
3. Grundvandskemi. Viden om grundvand, GEUS. [http://www.geus.dk/DK/popular-geology/edu/viden\\_om/grundvand/Sider/gv04-dk.aspx](http://www.geus.dk/DK/popular-geology/edu/viden_om/grundvand/Sider/gv04-dk.aspx)
4. Fødevarestyrelsens side "Mad med mindre kemi". <http://www.foedevarestyrelsen.dk/kampagner/madmedmindrekemi/Sider/default.aspx>
5. *miljø og sundhed* 15. årgang, supplement nr. 1, oktober 2009, p89-90.
6. Mørck TA, Nielsen F, Nielsen JK, Jensen JF, Hansen PW, Hansen AK, Christoffersen LN, Siersma VD et al. *The Danish contribution to the European DEMOCOPHES project: A description of cadmium, cotinine and mercury levels in Danish mother-child pairs and the perspectives of supplementary sampling and measurements*. Environ Res (in press).
7. Thit Aarøe Mørck. *Exposure to environmental toxicants in Danish schoolchildren and their mothers*. Ph.d-afhandling (in press).
8. Choi J, Mørck TA, Polcher A, Knudsen LE, Joas A. *Review of the state of the art of human biomonitoring for chemical substances and its application to human exposure assessment for food safety*. European Food Safety Authority, EFSA supporting publications, EN-724, pp. 1-321, 2015.



---

# Risikovurdering af kosmetiske produkter - hvor er der behov for ny viden?

Af Ann Detmer, DHI

---

Risikovurdering eller sikkerhedsvurdering af kosmetiske produkter reguleres af Forordning 2009/1223/EF gældende fra 11. juli 2013. For hvert kosmetikprodukt skal der udarbejdes et dossier.

Overordnet består et dossier med produktinformation (PIF) af flg.:

1. en beskrivelse af det kosmetiske produkt, som tydeligt viser, at der er sammenhæng mellem produktinformationerne i dossieret og det kosmetiske produkt
2. CPSR (det kosmetiske produkts sikkerhedsrapport), som indeholder dels 2a. produktets sikkerhedsinformation og 2b. selve sikkerhedsvurderingen
3. GMP-statement vedrørende hele produktionen.

PIF'en kan være på engelsk eller på det lokale sprog. I tabel 1 kan rubrikkerne til informationskravene ses.

Tabel 1. Kosmetikproduksikkerhedsinformation

- Kvalitativ og kvantitativ formel
- Fysisk/kemisk karakterisering og stabilitet
- Mikrobiologisk kvalitet
- Urenheder, sporstoffer, informationer om emballeringsmateriale
- Normalt og rimeligt forudsigelig brug
- Eksponeringsscenario for det kosmetiske produkt
- Eksponering for ingredienser
- Toksikologiske profiler af alle ingredienser inkl. MoS-beregninger
- Uønskede virkninger = cosmetovigilance
- Informationer på det kosmetiske produkt

Der skal laves toksikologiske profiler af alle ingredienser, inkl. Margin of Safety (MoS)

beregninger. Fokus ligger på evaluering af lokal toksicitet. I vurderingen tages der hensyn til alle væsentlige toksikologiske absorptionsveje samt de systemiske virkninger, og der foretages en beregning af sikkerhedsmarginer (MoS) baseret på et niveau, hvor der ikke observeres skadelige virkninger (no observed adverse effects level -NOAEL). Opmærksomheden rettes særligt mod eventuelle indvirkninger på den toksikologiske profil, som skyldes:

- partikelstørrelse, herunder nanomaterialer
- urenheder i de stoffer og det råmateriale, der anvendes, og stoffernes interaktion

Eventuelle analogiseringer dokumenteres og begrundes behørigt, og informationskilden skal være klart angivet.

For hver brugt ingrediens skal der findes data for følgende toksikologiske endpoints (tabel 2):

Tabel 2. Toksikologiske endpoints ingredienser

1. Akut toksicitet (hvis muligt)
2. Irritation og korrosivitet (hud og øjne)
3. Hudsensibilisering
4. Dermal absorption
5. Toksicitet ved gentagen dosering
6. Mutagenitet/genotoksicitet
7. Carcinogenitet
8. Reproduktionstoksicitet
9. Toksikokinetik
10. Photo-induceret toksicitet
11. Humane data

De toksikologiske endpoints, som skal vurderes, adskiller sig ikke fra andre risikovurderinger. Til udfyldelse af de toksikologiske endpoints bliver der fortrinsvis brugt data fra gamle dyreforsøg. Der har siden 2004 været

---

forbud mod brug af forsøgsdyr til testning af kosmetiske produkter og siden 2009 også for kosmetiske ingredienser. De sidste undtagelser (kronisk toksicitet, reproduktionstoksicitet og toksikokinetik) fra forbuddet mod testning på dyr blev fjernet i 2013, så nu er der totalforbud mod at bruge dyr til testning af kosmetik, uanset om det sker i eller uden for Europa. Man må dog bruge de gamle data eller nye data, som genereres som del af en REACH-registrering af det kemiske stof. REACH-data findes for kemikalier, som i Europa anvendes til andre formål end kosmetik. Der bliver også brugt data genereret ved simulering og fra analogi til data fra anden anvendelse, f.eks. i fødevarer eller lægemidler.

Sikkerhedsvurderingen udføres efter de retningslinjer, som kan ses i forordningens artikel 10, og overalt i vurderingen bruges en "weight of evidence"-tilgang, og al information vurderes samlet. Ud over en identifikation og karakterisering af de iboende farer indgår eksponeringsvurdering og risikokarakterisering for hver enkelt ingrediens og samlet for det formulerede produkt. Formålet med risikokarakteriseringen er at vurdere, om anvendelse af et kosmetisk produkt er "sikker". Her betyder ordet "sikker", at risikoen forbundet med anvendelsen er under kontrol, og at der ikke forventes skade på brugeren. For risikokarakteriseringen af kosmetiske produkter bruges en MOS-beregning, og denne skal være >100, for at produktets anvendelse kan vurderes som sikker.

På basis af alle de ovennævnte oplysninger om indeholdte råvarer, produktets brug og eksponering, type af brugergruppe med mere kan den sammenfattende sikkerhedsvurdering af det kosmetiske produkt udarbejdes. Konklusionen på vurderingen er en erklæring om det kosmetiske produkts sikkerhed. Selve sikkerhedsvurderingen skal udføres af en kompetent person, og som dokumentation herfor skal der vedlægges et CV på den person, der laver sikkerhedsvurderingen. Kravene er minimum en akademisk uddannelse inden for farmaci, toksikologi, medicin eller lignende.

Hvad giver forsøgsdyrsforbuddet af konsekvenser? I praksis ikke så meget for produkter lavet af ingredienser, der allerede er på markedet. Kosmetikindustrien har accepteret forbuddet mod at bruge forsøgsdyr, og der bliver i stedet udført *in vitro* og *in silico* forsøg og en del forsøg på mennesker (HRIPT - Human Repeat Insult Patch Test), dette sker især i USA. I Europa er opfattelsen, at det ikke er etisk forsvarligt at bruge mennesker til test af kontaktallergi ved kosmetik. Hvis ikke et kosmetisk produkt fungerer godt, bør det fanges i kosmetovigilance overvågningen (bivirkningsrapportering), og produktet kan trækkes tilbage fra markedet, hvis tiltag til at forbedre produktet ikke er tilfredsstillende.

I realiteten bliver brugere af kosmetik dog delvist brugt som forsøgsdyr, da vores viden om induktion af eksempelvis allergi ikke er tilstrækkelig. Der er mangel på viden vedr. dosis for induktion af kontaktallergi, og om hvad der er sikker dosis for allerede inducerede personer. Der mangler også viden om sammenhængen mellem brug på huden af naturlige ingredienser, som indeholder allergene proteiner, og senere fødevarerallergi. Viden om graden af hudabsorption er kritisk i MOS-beregningen af kosmetiske ingredienser, da en default-værdi på 100 % skal bruges, når der mangler data, medmindre ingrediensen/kemikallet har  $\text{LogP}_{\text{ow}} < -1$  eller  $> 4$  og en molekylvægt  $> 500$  Dalton. Da må man i stedet bruge en default-værdi på 10 % (1). Yderligere kendskab til interaktioner mellem forskellige kosmetiske ingredienser og påvirkning af hudabsorption vil give en mere nøjagtig MoS-kalkulering.

For at lave en toksikologisk profil af helt nye ingredienser, som ikke er brugt til andet end kosmetik, er der behov for at bruge andre metoder end dyreforsøg. EU har satset 238 millioner Euro på forskning i alternative test til forsøgsdyrstest, og der er behov for langt større midler til forskning for at kunne erstatte alle dyreforsøg. Forskningsprogrammet SEURAT-1 (FP7) [www.seurat-1.eu](http://www.seurat-1.eu), finansieret af både EU og Cosmetics Europe, forsøger at erstatte



---

dyreforsøg med gentagen dosering. En sammenfatning af allerede opnåede resultater fra dette forskningsprogram og anbefalinger for kommende forskning kan læses i Daston et al 2014 artikel i Arch. Toxicol; SEURAT: Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing - Recommendation for future research in the field of predictive toxicology (2). Der er allerede kommet mange rigtigt gode resultater fra forskningen, men for nogle endpoints er det meget svært at erstatte dyreforsøg. For kosmetikindustrien er der behov for mere forskning i, hvad gentagen dosering betyder, i hudabsorption og i forudsigtelse af allergi. For helt nye kemikalier, som udelukkende anvendes i kosmetik, mangler der mulighed for at vurdere sikkerheden for mennesker, og hvorvidt koncentrationen i kosmetikproduktet overskrider TTC-tærsklen (threshold of toxicological concern). Det kan bremse udviklingen af nye kosmetiske ingredienser i Europa.

For at kunne beregne MOS er der behov for et udgangspunkt for vurderingen, altså en udgangsværdi (en point of departure) i form af en NOAEL-værdi fra et dyrestudie (den højeste dosis, hvor der ikke ses skadelige effekter). Her mangler der stadig en fuldt udviklet metode, som kan erstatte NOAEL-værdier fra dyreforsøg. Mest lovende i dag er en kombination af matematisk modellering, PBTK (physiology based toxicokinetics) modellering, og MOA/AOP (mode of action/adverse outcome pathways) samt OMICs analyser. Sammen med effektive og fuldautomatiske screeningsmetoder kan disse nye metoder til at karakterisere toksicitet forhåbentlig give en ny indgang til risikovurdering. Den virkelig krævende udfordring er at finde lovgivningsmæssig accept for denne nye måde at foretage risikovurderinger på.

Hvis man ser risikovurdering af kosmetiske produkter fra et samfundsperspektiv, er der også andre eksponeringsveje at tage højde for, eksempelvis fra fødevarer, fra lægemidler og fra og til miljøet. Denne samlede eksponering kan føre til restriktioner for brug i kosmetiske

produkter, selv om sikkerheden er god for kosmetisk brug.

Sikkerhedsvurderingen af kosmetiske produkter omhandler ikke miljørisikovurdering. Miljørisikovurdering af kosmetiske produkter bliver gjort inden for REACH (kemikalielovgivningen). Som eksempel kan tages cyclomethicone (D4 og D5), som blandt andet bruges for at det kosmetiske produkt skal føles godt på huden og virke blødgørende. D4 er et PBT stof (persistente, bioakkumulerende og giftige stoffer), og D5 er vPvB (meget persistent og bioakkumulerende). Begge stoffer forbliver altså meget lang tid i naturen. For at vurdere muligheden for at regulere brugen af cyclomethicone i kosmetiske produkter har den engelske miljømyndighed udarbejdet en hensigt om restriktion med en foreslået begrænsning af brugen af cyclomethicone i skylleprodukter på max 0,1 % af hvert stof af D4 og D5. Dette for at mindske udslippet via afløbet, da cyclomethicone ad den vej ender direkte i naturen.

Yderligere information:

Ann Detmer

[ad@dhigroup.com](mailto:ad@dhigroup.com)

## Referencer

1. De Heer C, Wilschut A, Stevenson H, Hakkert BC. *Guidance document on the estimation of dermal absorption according to a tiered approach: an update*. TNO-report V98.1237, TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands, 1999.
2. Daston G, Knight DJ, Schwarz M, Gocht T, Thomas RS, Mahony C, Whelan M. *SEURAT: Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing--recommendations for future research in the field of predictive toxicology*. Arch Toxicol 2015;89(1):15-23.

---

# Adverse Outcome Pathway (AOP) - et værktøj til beskyttelse af menneskers helbred

Af Marianne Dybdahl, DTU Fødevareinstituttet

---

## Baggrund

Regulatorisk toksikologi er i disse år inde i en spændende udvikling. Der er stigende interesse for at erstatte eller supplere traditionelle dyreforsøg med brugen af alternative metoder såsom celleforsøg og computermodeller, hvilket kan mindske brugen af forsøgsdyr i overensstemmelse med 3R principperne. Brugen af alternative metoder giver også mulighed for at forstå og beskrive de molekylære og cellulære mekanismer, der fører til toksiske effekter, og kan dermed bidrage til en bedre vurdering af kemiske stoffers sikkerhed for mennesker. Data fra alternative metoder kan desuden typisk genereres hurtigere og billigere sammenlignet med dyreforsøgsdata.

Brugen af mekanistiske data i risikovurderinger er endnu ret begrænset, hvilket især skyldes, at relevansen af mange alternative *in vitro* og *in silico* data ikke er klarlagt i tilstrækkeligt omfang. Der er derfor brug for en bedre forståelse af sammenhænge mellem effekter målt på molekylært og cellulært niveau og toksikologiske effekter udtrykt på højere biologisk niveau (f.eks. organfunktion).

Forskning gennem mange dekader har genereret en enorm mængde af mekanistisk viden i den videnskabelige litteratur, så den store udfordring her og nu er at få samlet og systematiseret al denne viden. En indsats på dette område er vigtig for at kunne udnytte relevant mekanistisk information til bedre beskyttelse af menneskers sundhed i en regulatorisk sammenhæng. Til at hjælpe dette arbejde på vej er det såkaldte 'Adverse Outcome Pathway' (AOP) koncept blevet udviklet. AOP konceptet er en slags skabelon til at organisere og forstå komplekse biologiske systemer og de forstyrrelser af systemerne, der fører til toksicitet.

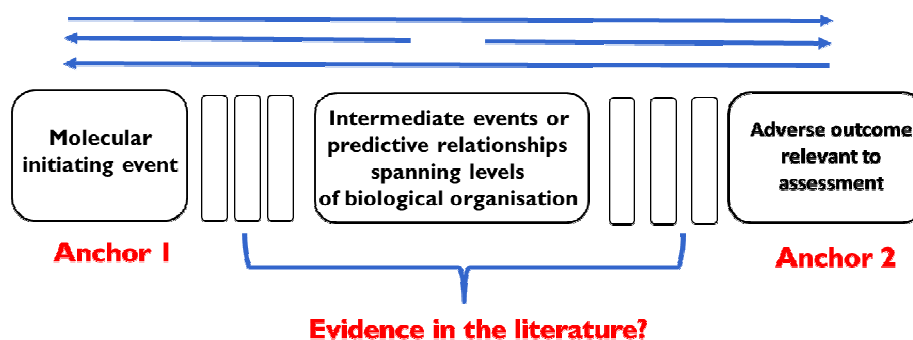
Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) har stort fokus på dette arbejde og igangsatte i 2012 et internationalt AOP arbejdsprogram.

## Hvad er en AOP?

En AOP beskriver den biologiske pathway, et stof virker igennem fra en forstyrrelse på molekylært plan til en uønsket effekt af regulatorisk relevans. En AOP er på den måde et ideelt værktøj til at organisere mekanistisk viden, således at denne information bliver lettere tilgængelig for både den videnskabelige og regulatoriske verden. En AOP starter med en såkaldt 'Molecular Initiating Event' (MIE), hvor det kemiske stof interagerer med et biologisk target, f.eks. en receptor og trigger en efterfølgende serie af 'Key Events' (KE), som er cellulære, anatomiske og/eller funktionelle ændringer i biologiske processer, der ultimativt resulterer i en 'Adverse Outcome' (AO) i en organisme eller population. MIE og AO udgør således de to ankre i en AOP, hvorimod KE er de intermediære trin, som foregår på de forskellige biologiske niveauer (figur 1). Der findes ikke rigtig nogle gode danske navne for AOP, MIE, KE og AO, så derfor bruges de engelske termer i denne artikel.

Anvendte forkortelser
AOP: Adverse Outcome Pathway(s)
MIE: Molecular Initiating Event(s)
KE: Key Event(s)
AO: Adverse Outcome(s)

Figur 2 viser en skematisk fremstilling af en AOP med eksempler på MIE, KE og AO. Biologiske pathways er ofte et netværk af cellulære funktioner, som er reguleret på koordineret vis for at tilpasse sig organismens behov.



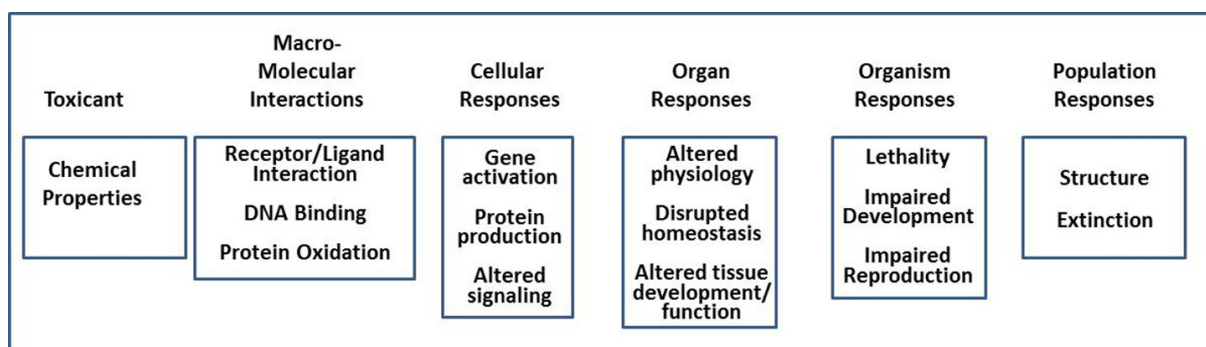
Figur 1. Opbygning af en AOP med de forskellige byggeblokke. Fra OECD 2013.

Det er derfor vigtigt at bemærke, at AOP ofte ikke er lineære pathways, men i virkeligheden netværk af AOPs. En MIE/KE kan føre til mange forskellige AO, og en AO kan omvendt skyldes mange forskellige MIE/KE.

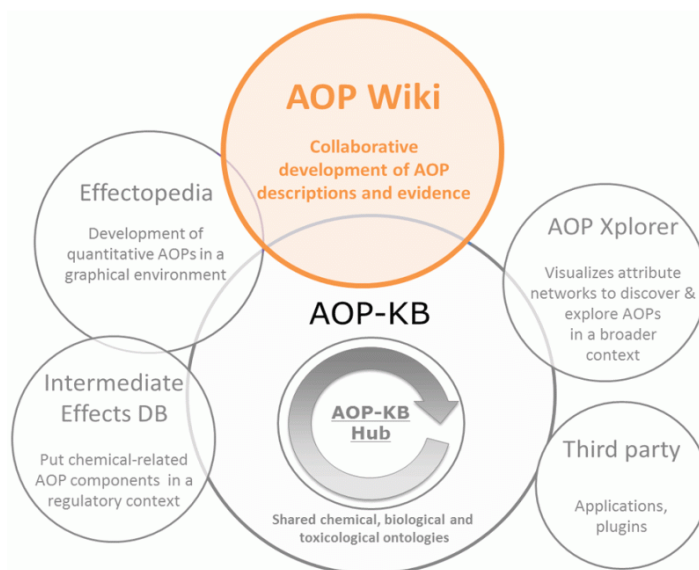
### Udvikling af en AOP

En AOP kan variere i detaljerings- og modningsgrad og kan indeholde både kvalitative og kvantitative beskrivelser af KE og sammenhængen mellem disse KE. Udvikling af en AOP starter med et forslag til en pathway. Hvis muligt, kan den bygges op omkring de to ankre, MIE og AO (den regulatorisk relevante effekt), men i princippet kan man starte hvor som helst i en pathway. AOPen udbygges så ved at kortlægge og beskrive de forskellige KE samt deres sammenhænge. Evidensen for de forskellige trin i en given AOP kan stamme fra forskellige kilder, typisk fra relevante literatur-

studier og/eller fra resultater fra eksperimenter, som er designet specielt til at udfylde huller i den eksisterende viden. I praksis vil udvikling af en ny AOP normalt starte med en grundig gennemgang af den relevante litteratur. En AOP kan gøres endnu stærkere ved at inkludere kvantitative sammenhænge, da det kan give en mere sikker forudsigelse af en AO baseret på en KE. Toksikokinetik er ikke en integreret del af AOP, hvilket betyder, at overvejelser skal gøres for alle biologisk relevante metabolitter samt selve kemikaliet. En ekstra gevinst ved opbygning af en AOP er, at det giver et godt overblik over den eksisterende viden på området og dermed også et overblik over, hvor der er huller og mangler vigtig information. På denne måde kan AOP arbejdet bidrage til en mere målrettet og fokuseret planlægning af nye eksperimenter.



Figur 2. Skematisk fremstilling af en AOP med eksempler på MIE, KE og AO. Fra OECD 2013.



Figur 3. Skematisk fremstilling af opbygningen af AOP-KB. Se link i referencelisten.

### AOP arbejdet i OECD regi

For at støtte op om AOP arbejdet lancerede OECD i 2012 et internationalt AOP program, som koordineres af OECD gruppen med navnet 'Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics'. Danmark følger nøje dette arbejde og er repræsenteret i OECD gruppen ved forfatteren af nærværende artikel. Der er publiceret en OECD guideline, hvor det primære formål var at introducere nogle standarder og kriterier for AOP udvikling for at sikre, at AOP beskrivelserne indeholder den nødvendige information, som gør dem anvendelige for forskellige regulatoriske formål (OECD 2013).

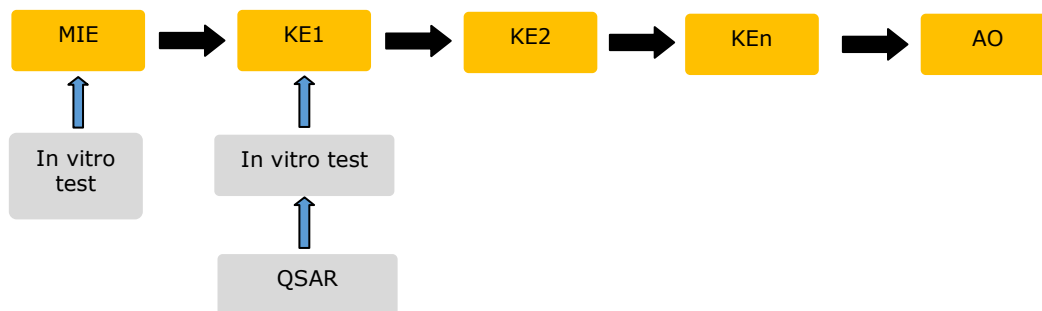
Det blev ret hurtigt i OECDs AOP program erkendt, at statiske dokumenter ikke er en ideel vej frem, hverken til udvikling af AOPer eller til udbredelse af AOP viden. Derfor blev der udviklet en AOP Knowledge base (AOP-KB; <https://aopkb.org>), som bl.a. indeholder AOP-Wiki (<https://aopkb.org/aopwiki>). AOP-Wiki er en web-baseret platform, hvor udvikling og deling af AOP viden kan foregå i et åbent forum, og hvor forskellige grupper af forskere kan arbejde sammen om at opbygge og evaluere en AOP. AOP-Wiki er også tænkt som et

forum, hvor eksisterende AOPs kan forfines, efterhånden som ny viden kommer til. På sigt er det planen at få lagret en samling af AOPer i AOP-KB, som kan bruges til forskellige regulatoriske formål. Figur 3 viser opbygningen af AOP-KB med AOP-Wiki og de andre moduler, som alle vil blive en integreret del af AOP-KB.

### Hvordan kan AOP bruges til at beskytte menneskers sundhed?

Cirka 40 AOPs er under udvikling i OECD programmet dækkende en lang række forskellige effekter inden for f.eks. reprotox, neurotox og cancer. En liste over AOPs under udvikling findes på OECDs AOP hjemmeside (se link i referencelisten).

Det er vigtigt at være opmærksom på, at en AOP vil kunne anvendes til forskellige formål, afhængig af detaljerings- og modningsgrad. Eksempler på områder, hvor en AOP vil kunne bidrage er: gruppering af kemikalier, udvikling af teststrategier samt udvikling af nye *in vitro* og QSAR modeller. QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) er computermodeller, som beskriver sammenhængen mellem den kemiske struktur og en biologisk/



Figur 4. Brug af AOP til at udvælge metoder til nye test guidelines. Modificeret fra OECD IATA/AOP workshop, november 2014.

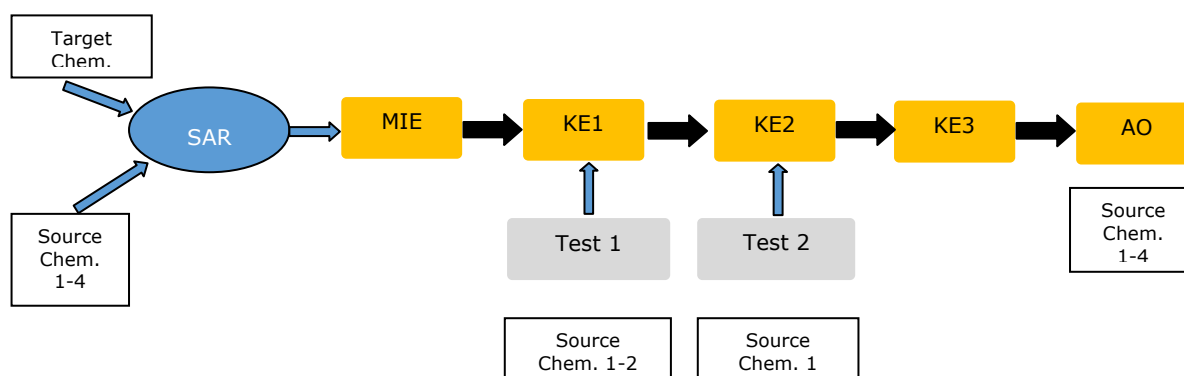
toksikologisk effekt. I det følgende er eksempler på brugen af AOP i forskellige sammenhænge beskrevet og illustreret.

#### Brug af AOP til at udvælge metoder til nye test guidelines

En AOP kan hjælpe med at identificere vigtige steps (MIE/KE) på molekylært/cellulært plan, som er stærkt forbundet med en given uønsket effekt (AO), dvs. at hvis et eller flere steps induceres af et kemisk stof, er der stor sandsynlighed for, at udsættelse for stoffet fører til den uønskede effekt. Dette vil selvfølgelig afhænge af den varighed og dosis, stoffet påvirker systemet med, og dermed hvor kraftig en forstyrrelse, der induceres.

Hvis man kan måle en KE i en AOP i en *in vitro* testmetode, vil man kunne anvende denne

testmetode til at forudsige en eventuel AO. I princippet er det nødvendigt, at alle KE i en AOP bliver induceret for at en AO forekommer, men i praksis vil det være smart at identificere den/de mest essentielle KE og udvikle alternative testmetoder for dem. Dette vil dels sørge for at ressourcerne bruges på at udvikle de vigtigste metoder og dels begrænse antallet af test, der kræves for at forudsige toksiciteten af et kemikalie. Det er også muligt at bruge computermodeller til at forudsige, om en eventuel AO vil forekomme. Hvis der findes en *in vitro* test for en KE og den er blevet anvendt til at teste et større antal kemiske stoffer, kan resultaterne eventuelt bruges til udvikling af en QSAR model. Figur 4 viser, hvordan en AOP kan bruges til at udvælge nye alternative test metoder.



Figur 5. Brug af AO til gruppering af kemikalier. Fra OECD IATA/AOP workshop, november 2014.

### Brug af AOP til gruppering af kemikalier

I figur 5 er der vist et eksempel, hvor 4 kemikalier (source chemicals) giver den samme uønskede effekt. Det kemikalie, der ønskes undersøgt (target chemical), ligner de 4 stoffer med hensyn til den kemiske struktur, men det vides ikke, om kemikaliet også giver denne uønskede effekt. Der er udviklet en AOP, hvor tre KE er identificeret, og for to af disse findes der testmetoder. Desuden findes der en SAR (Structure Activity Relationship), som kan forudsige MIE. Baseret på den anvendte SAR vil både de 4 kildestoffer og målstoffet inducere MIE, hvilket sandsynliggør, at målstoffet også giver den uønskede effekt. To af kildestofferne inducerer KE1, mens et af disse stoffer også inducerer KE2. Disse observationer tyder på, at alle 4 kildestoffer udøver deres toksiske effekt via den samme AOP. Det er derfor også sandsynligt, at målstoffet vil følge denne pathway og føre til samme AO. Eksemplet viser, hvordan AOP kan bruges til at gruppere kemikalier på baggrund af information om både deres kemiske struktur og virkningsmekanisme.

### Brug af AOP til udvikling af teststrategier

Figur 6 viser et eksempel på, hvordan en AOP kan bruges til at optimere en teststrategi. I det viste eksempel er MIE og to KE velkarakteriserede, og *in silico*, *in chemico* og *in vitro* metoder er tilgængelige. Målet for fremtidens teststrategier er at samle information fra en kombination af alternative dyrefri metoder, der adresserer forskellige KE i en AOP. Det er også et ønske at anvende denne information på en trinvis måde, således at informationen fra hvert trin bruges til at beslutte, hvilke testsystemer, der vil generere den mest relevante information i det efterfølgende trin og for den overordnede beslutning.

I figur 6 kan MIE karakteriseres ved hjælp af en QSAR model, og udfaldet herfra bestemmer de efterfølgende testsystemer. En positiv QSAR forudsigelse (trin 1) giver anledning til testning (trin 2) i en KE1 test med lav forekomst af falsk positive, hvorimod en negativ QSAR forudsigelse fører til testning (trin 2) i en test med lav forekomst af falsk negative. Hvis der er overensstemmelse mellem resultaterne i trin 1 og trin 2, kan stoffet karakteriseres som enten positivt eller negativt.

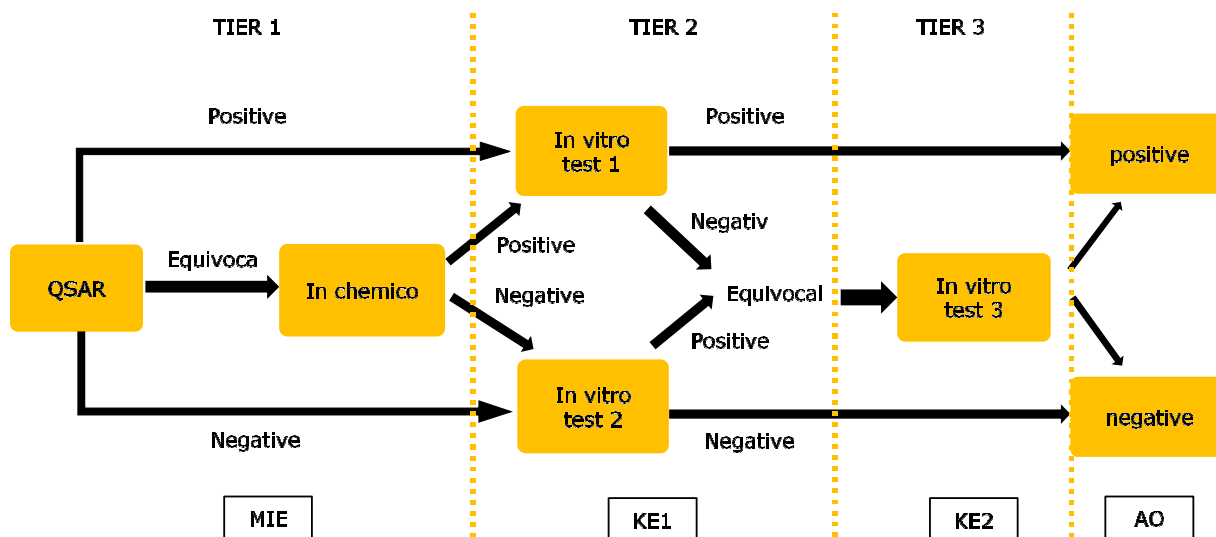


Figure 6. Brug af AOP til udvikling af teststrategier. Fra OECD IATA/AOP workshop, november 2014.



---

For de stoffer, hvor der ikke kan genereres en entydig QSAR forudsigtelse (equivocal), findes der i det viste eksempel en *in chemico* test, der kan bruges til at opnå ekstra information om MIE og til at beslutte videre testning. Stoffer, hvor der er uoverensstemmelse mellem resultater fra trin 1 og trin 2, testes videre i trin 3 i en test, som adresserer KE2. Til sidst foretages en samlet vurdering (weight-of-evidence), som den endelige beslutning baseres på.

### Perspektiver

Regulatorisk toksikologi undergår i disse år en transformation, hvor brugen af traditionelle dyreforsøg erstattes eller suppleres med brugen af alternative metoder såsom celleforsøg og computermodeller. Motivationen til dette paradigmeskifte er et kollektivt ønske fra både forskningen, myndigheder og industrien om at udnytte de nyeste videnskabelige gennembrud og teknologiske landvindinger til risikovurdering af kemiske stoffer.

Med introduktionen af OECDs AOP program er det første step på vejen til bedre udnyttelse af mekanistisk viden taget. En vigtig del af programmet har været udviklingen af AOP-Wiki, som er en web-baseret platform, hvor

udvikling og deling af AOP viden kan foregå i et åbent forum, og hvor forskellige grupper af forskere kan arbejde sammen om at opbygge og evaluere en AOP. AOP-Wiki er også tænkt som et forum, hvor eksisterende AOPs kan forfines, efterhånden som ny viden kommer til. På sigt er det planen at få opbygget en samling af 'klar-til-brug' AOPs, som kan bruges til forskellige regulatoriske og videnskabelige formål.

Yderligere information:

Marianne Dybdahl  
[mdyb@food.dtu.dk](mailto:mdyb@food.dtu.dk)

### Referencer

Organisation for Economic Co-operation and Development. (2013). Guidance document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways Series on Testing and Assessment No. 184 ENV/JM/MONO (2013)6.

Organisation for Economic Co-operation and Development. Workshop on the development and use of integrated approaches to testing and assessment. Hosted by the US EPA in Washington DC, 17-19 November 2014 ( In press).

Link til OECDs AOP hjemmeside:

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>



---

## Føtal eksponering målt ved human placentaperfusion

Af Line Mathiesen, Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

---

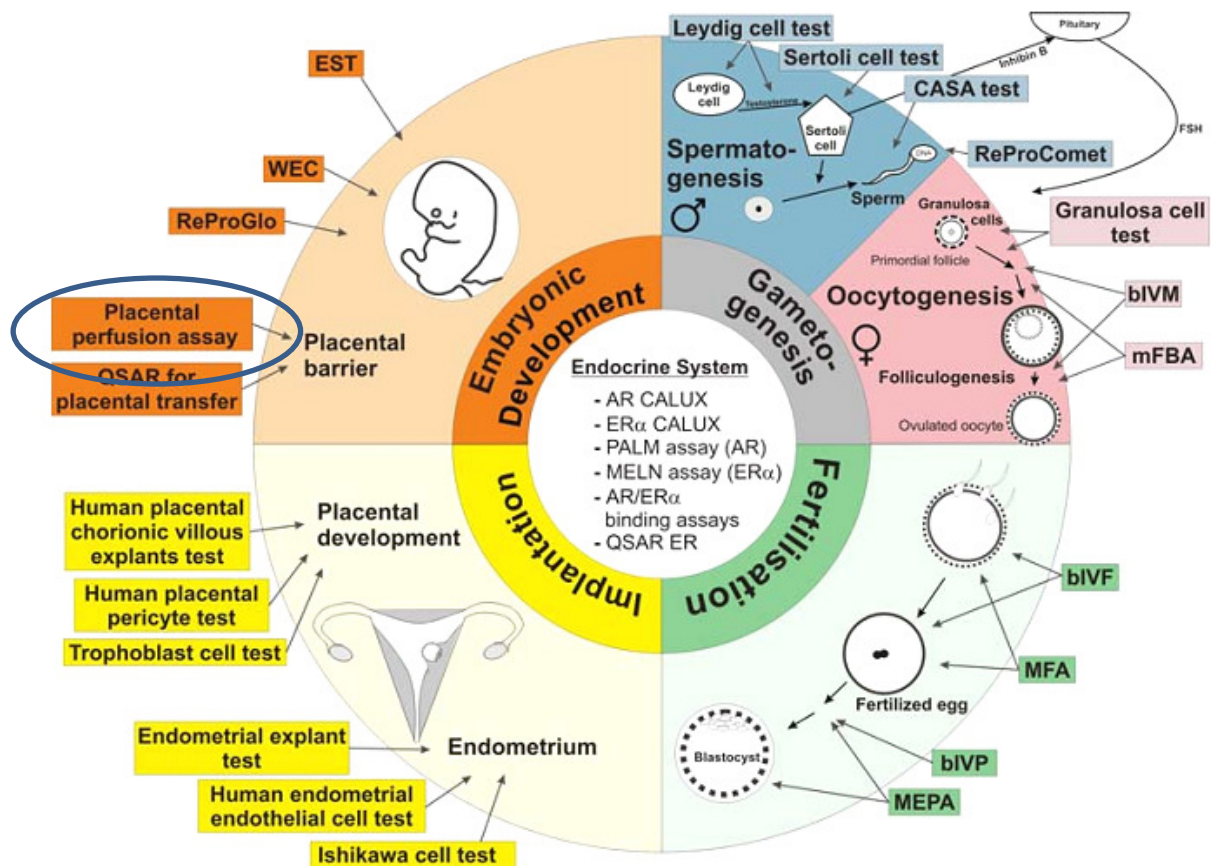
Under flere forskningsområder samt i toksikologiske tests foregår der en udfasning af brug af forsøgsdyr. Dette skyldes ikke kun regulering i forhold til antal forsøgsdyr i forbindelse med lovgivning og 3R princippet, men også at den prædiktive værdi ved dyreforsøg ikke er høj nok, når det gælder forskning i human eksponering. Især inden for reproduktion og føtal eksponering er det vigtigt at bruge metoder, der er baseret på humant væv, da der her er store forskelle mellem dyr og mennesker. Gestationslængde og fostrets udviklingsstadier er meget forskellige mellem dyrearter, og placenta udviser den største forskel, der er at finde mellem organer fra forskellige dyr. Placenta fra forskellige dyrearter viser bl.a. forskelle i struktur, antal cellelag, der adskiller mor og foster, gennemstrømning af mors og fosters blod, produktion af hormoner og immune celletyper i placenta (1). Dette gør det meget vanskeligt at ekstrapolere data fra dyreforsøg til mennesker.

Placenta er et midlertidigt organ bestående af celler fra moder og foster, som under graviditeten danner en barriere mellem det føtale og det maternale kredsløb, hvorigennem nærings- og affaldsstoffer bliver transporteret. Placental toksikokinetik (optagelse, omdannelse m.m.) - herunder transport og eventuel metabolisme, er derfor et vigtigt element i den føtale risikovurdering. Fostret er under udvikling og er i hurtig vækst, hvilket gør den føtale periode til særligt sensitiv. Fokus på fosterets eksponering for fremmedstoffer er rettet mod en lang række kemikalier, som forekommer i miljøet. Stoffer som Benzo(a)pyren (2), Bisphenol A (3), bromerede flammehæmmere (4) og polyklorede bifenylere (PCB) (5), som har carcinogene og hormonforstyrrende egenskaber, har vist sig at krydse placenta under graviditeten i perfusionsstudier af den humane placenta. Perfusionsmodeller er meget anvendt ved studier af

levende væv. Placentaperfusionsmodeller anvendes i studier af transport af stoffer fra mor til foster under graviditeten samt i undersøgelser af metabolismen af disse stoffer i placenta. Modellen kan også bruges til at undersøge effekten af stofferne på placenta-vævet, inklusive morbiditet og ændring i hormonproduktion.

Med *in vitro* testsystemer er det muligt at finde svar på mere specifikke virkninger i udvalgte dele af reproduktionscyklus. Et nyligt afsluttet EU projekt, ReProTect, havde til formål at udvikle alternative metoder til dyreforsøg inden for reproduktionstoksikologi, og mere end 25 forskellige testsystemer blev udviklet eller forbedret inden for områderne fertilitet (både han og hunlig), implantation og fosterudvikling. Fra slutrapporten er taget figur 1, som viser de testsystemer, der er arbejdet med i ReProTect. Resultater af ReProTect er angivet i et særnummer 30(1) af *Reproductive Toxicology* fra 2010 (6).

Placentaperfusionsgruppen ved Institut for Folkesundhedsvidenskab er lokaliseret på Center for Sundhed og Samfund (CSS), Københavns Universitet i nærheden af Rigshospitalet, hvor vi har adgang til placenta fra fødegangen, og hvor vi har samarbejdet og har videnskabsetisk godkendelse siden 2004. Placenta består af 20-40 mindre vaskulære enheder: kotyledoner. I kotyledonet adskilles det føtale og det maternale kredsløb af få cellelag. Placentaperfusionsmodellen er opstillet således, at et enkelt kotyledon fra placenta, som suppleres af et enkelt føtalt arterie-vene par, reperfunderes direkte efter fødslen. Den opstillede placentaperfusionsmodel benytter placenta fra kvinder med ukompliceret graviditet og fødsel fra fødegangen på Rigshospitalet, umiddelbart efter planlagte kejsersnit. En informeret samtykkeerklæring underskrives af

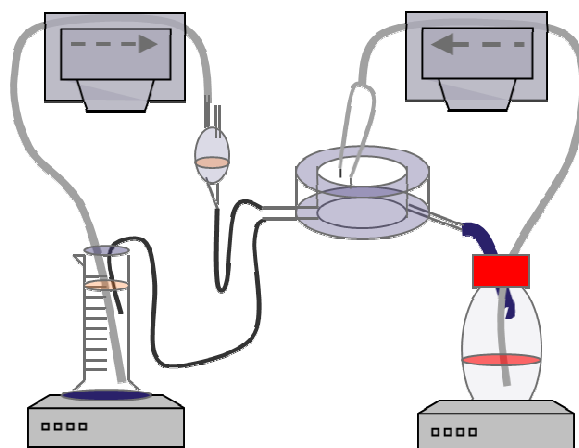


Figur 1: *In vitro* test systemer fra ReProTect projektet (Development of new *in vitro* tests to replace animal experimentation in reproductive toxicology) og hvilket stadium i den humane reproduktions cyklus de repræsenterer. Den blå ring er sat om placentaperfusionsmodellen, som er under den embryonale udvikling og repræsenterer den placental barrier. Figuren er venligst stillet til rådighed af Michael Schwarz.

Moderen, inden placenta modtages. Ingen personidentificerbare oplysninger gemmes, hvorfor der er tale om anonyme donationer. De mødre, der selv har valgt at føde ved kejsersnit (elektivt sectio), er til møde på Rigshospitalet dagen inden deres sectio. De skal tale med jordemoder og narkoselæge, og her fortæller vi om vores forsøg og spørger, om de vil donere deres placenta samt indsamler de underskrevne samtykkeerklæringer.

Efter sectio modtages placenta fra jordemoder på fødegangen, hvor der i de store placental kar indsprøjtes ca. 50 ml perfusionsbuffer med heparin for at forhindre koagulering af blod i

det føtale system. Derefter lægges placenta i en isoleret bærekasse og transporteres til laboratoriet. Her undersøges placenta for passende føtalt arterie-vene par til kanulering, og efter succesfuld kanulering klippes det perfunderede kotyledon ud og lægges i perfusionskammer med maternel side op. Herefter kan perfusionskammeret med perfunderet kotyledon sættes i systemet i opvarmet 37°C flowbænk til studie i op til seks timer (Se figur 2). Føtal og maternel cirkulation i kotyledonet er hermed kunstigt genoprettet, og et udvalgt stof kan tilsættes til maternel cirkulation, og transport af dette til føtal side over tid kan undersøges (7).



Figur 2. Billede og optegnet model af den humane placentaperfusionsmodel. Til venstre i systemet ses den føtale cirkulation med bubble-trap og til højre i systemet se den maternelle cirkulation. I midten kammer med placenta.

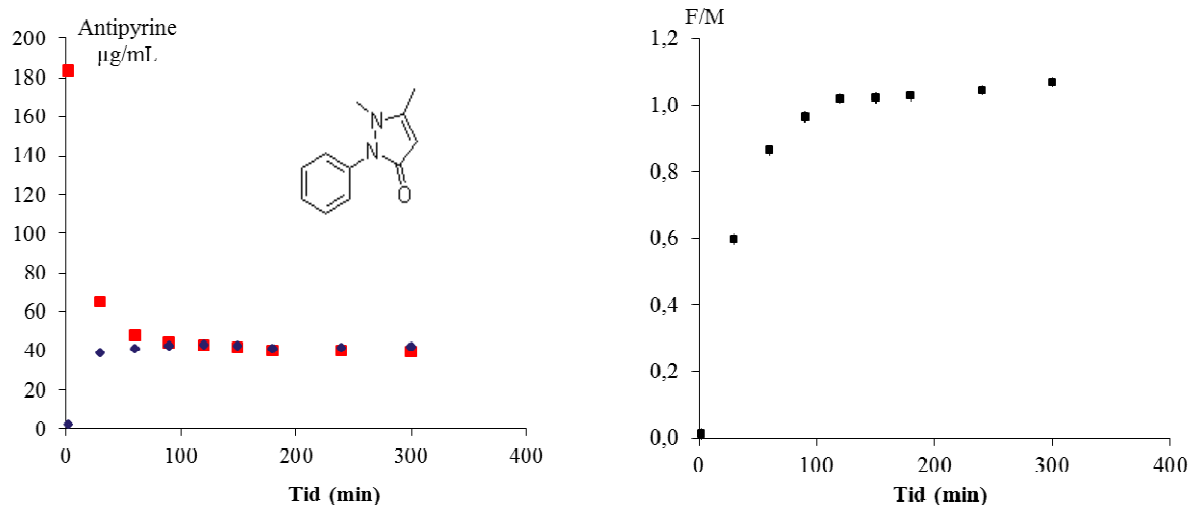
For at bestemme stoffernes koncentration, og eventuel transport, i de to kredsløb, udtages der prøver fra både det føtale og det maternelle kredsløb ved forskellige tidspunkter under hele forsøget. Prøverne analyseres herefter med forskellige teknikker afhængig af hvilket stof, der undersøges (7). Opsamlingen af prøver fra det føtale og det maternelle kredsløb og vævsprøver af placenta før og efter tilsætning af et givent stof giver informationer om et intakt humant organ. Som kontrol for at vævet forbliver intakt under hele forsøget, og at perfusionerne kan betragtes som vellykkede, måles lækage fra den føtale cirkulation samt vævets optag af glukose og ilt. Som positiv kontrol for den eksperimentelle opstilling samt til at normalisere forskelle mellem placentae anvendes analyse af transport af stoffet antipyrin fra maternel til føtal cirkulation (se figur 3).

Som et mål for transport over placenta fra maternel til føtal side bruges føtal/maternel ratio (F/M ratio). Dette giver et udtryk for transportkinetik og gør det nemt at sammenligne transport af forskellige stoffer, da det eliminerer koncentration tilsat og måleenheder (mol, g/l, Bq). På F/M ratio kurven kan aflæses "indicative permeability" ved 30 minutters perfusion (IP30), som er kurvens hældning fra 0-30 minutter, og "area under curve" indtil 120

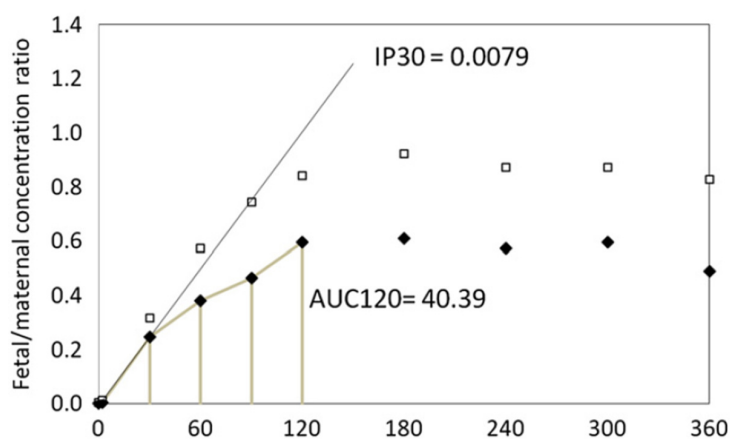
minutters perfusion (AUC120), som er arealet målt under kurven fra 0 til 120 minutters perfusion (se figur 4).

Interlaboratorie sammenligninger er udført med to laboratorier i Finland, hvilket validerer modellen (6). Cellulære transportmekanismer i den humane placenta kan undersøges efter studiets afslutning ved konfokal og elektronmikroskopi af det perfunderede placentavæv (8,9). Data opnået ved brug af human placentaperfusionsmodel kan med fordel anvendes i quantitative structure-activity relationship (QSAR) og adverse outcome pathways (AOP) modellering for at karakterisere kemikaliekinetik i den humane organisme (10).

Den placentale transport ændres gennem graviditeten, idet placenta udvikler og differentierer sig gennem hele graviditeten. Der sker blandt andet ændringer i cellebarrierer, pH, antal og tykkelse af celleglag samt øgning i overflade areal. I 3. trimester af graviditeten ses færrest celleglag og den korteste afstand mellem fostrets og moderens blodårer i placenta sammenlignet med resten af graviditeten. Transporten af potentielt skadelige stoffer, som ses i *ex vivo* transportmodellen, hvor der bruges placenta fra termin, viser derfor "worst case scenario".



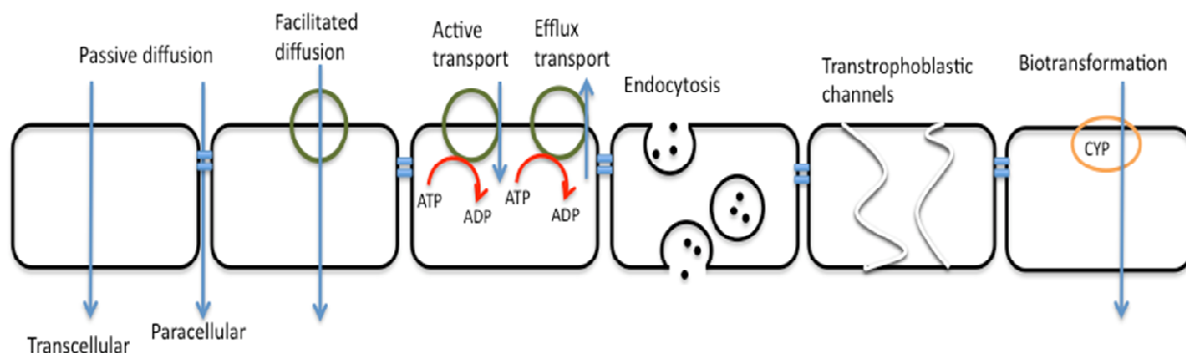
Figur 3. Til venstre ses graf af maternel (rød firkant) og føtal koncentration (blå rombe) af kontrolstoffet anti-pyrin fra fem timers placentaperfusion. Til højre ses føtal/maternal ratio (F/M-ratio) fra samme perfusion, hvor en F/M-ratio på 1 viser equilibrium mellem føtalt og maternelt system.



Figur 4. På grafen ses illustreret måling af IP30 og AUC120.

Transporten over placenta sker ved forskellige transportveje og mekanismer, herunder: passiv diffusion, faciliteret diffusion med medvirken af transportmolekyler i membranen, aktiv transport, som kræver energitilførsel, og transport via vakuoler, hvori der kan forefindes særlige receptorer, som forhindrer destruktion af bl.a. albumin og immunoglobuliner. Transportraten afhænger af stoffets fysiske/kemiske egenskaber så som størrelse, ladning og fedtopløse-

lighed. Generelt kan stoffer med en tilstrækkelig fedtopløselighed, en lav proteinbinding eller lav molekylvægt ( $<500\text{g/mol}$ ) passere placenta ved passiv diffusion. Andre stoffer kan aktivt transporteres over placentabarrieren ved enten at fungere som substrat for placentale transportmekanismer eller binde sig til et substrat og derved blive transporteret over barrieren (11) (se figur 5).



Figur 5. Transportmekanismer over trofoblastbarrieren (Tilpasset fra Marie Sønnegaard Poulsen (12)).

Nogle stoffer metaboliseres i placenta, hvilket ofte kan ændre stoffernes egenskaber - ikke kun toksikologisk, men også kemisk, hvilket eksempelvis kan betyde, at stoffer, der inden metabolisering ophobede sig i placenta-væv, efter omdannelse nu transporteres over i fosterets kredsløb. Studier i den humane placenta-perfusionsmodel viser, at tjærestoffet benzo(a)-pyren metaboliseres til mere vandopløselige og yderst carcinogene metabolitter i løbet af en 6 timers perfusion (2). Studier af placenta-perfusion i placenta fra kvinder kan dermed bidrage til at forstå miljørelaterede fremmedstoffers distribution og nedbrydelse i den humane placenta.

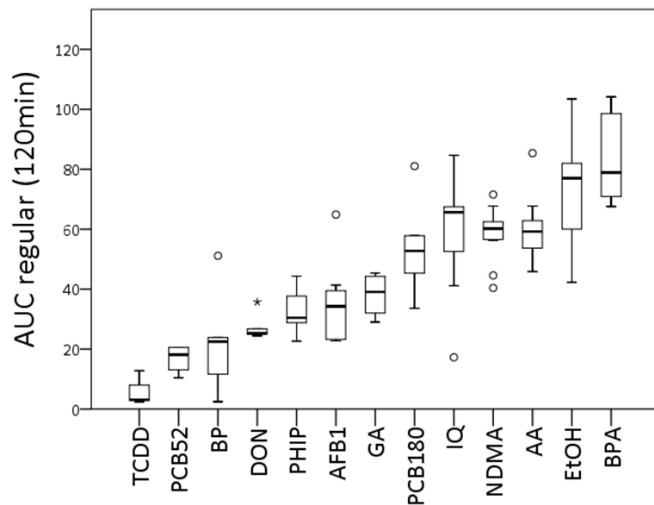
Transplacental transport af en række kemikalier, som kan forefindes i den gravide kvindes miljø, både fra fødevarer og indeklima, er undersøgt i en metaanalyse af *ex vivo* placental perfusionsstudier, og deres transport kan forklares af størrelse, fedtopløselighed og ioniseringsgrad (13) (se figur 6).

Yderligere er det fundet, at transplacental transportkinetik kan afhænge af halogeneringsgrad i studier af PCB (5) og bromerede flammehæmmere (PBDE) (4). Ved et nyligt studie af fire parabener sås det, at den terminale placenta ikke metaboliserer parabener, men overfører dem med uhindret kinetik til fosteret (14). Et samlet studie af 100 perfusioner udført i det samme laboratorium i København har vist, at indholdet af humant serumalbumin i perfusionsmediet har signifikant betydning for

transportkinetikken af kontrolstoffet antipyrene, hvilket understreger betydningen af at efterligne det fysiologiske miljø (14).

For nogle stoffers vedkommende kan man undersøge transport over placenta ved undersøgelse af blod fra moder og nyfødt. Analyser af blodet kan klarlægge hvilke stoffer, der optræder i moderens og barnets blod *in vivo*, og om der er en sammenhæng mellem indholdet af visse stoffer i moders og barns blod. Som eksempel kan nævnes bromerede flammehæmmere og dioxiner, hvor undersøgelse af navlesnorsblod har vist forekomst af disse stoffer i barnets kredsløb (4,15). Et fund af et stof i navlesnorsblod viser, at fosteret eksponeres for stoffet, men ikke hvordan og med hvilken hastighed stofferne transporteres fra moderens kredsløb til fosterets. Placenta-perfusionsmodellen giver et unikt billede af transporten over placenta i graviditeten og bidrager hermed med data til et felt, der er kompliceret at studere *in vivo*, da det kun er muligt at undersøge placenta-transport i navlesnorsprøver for stoffer, som allerede findes i den gravide kvindes miljø. Det er af etiske og praktiske grunde i de fleste tilfælde ikke muligt at studere transporten af stoffer over den humane placenta direkte i den gravide kvinde (4). Sammenholdes data fra blodanalyse og perfusionsstudier er det muligt opnå en større viden om de enkelte stoffers transport, deres aktivitet samt deres optag i mennesket, både som voksen og foster.





Figur 6. AUC efter 120 minutters perfusion: 13 kemikalier testet i New Generis program.

Placentaperfusionsmodellen er uden risiko for moder og barn, og derfor er de etiske aspekter af denne form for studie forholdsvis ukontroversielle. Eksperimentet er ikke invasivt, og vi modtager placenta efter fødslen, hvor den under normale omstændigheder ville være blevet bortskaffet. Moderen giver skriftligt samtykke inden fødslen og er derfor med til at vurdere, om hun ønsker at donere placenta.

Perfusionsmodellen er et alternativ til dyreforsøg og kan reducere antallet af dyreforsøg med henblik specifikt på placentatransport. Med denne model er det ikke nødvendigt at ekstrapolere fra forsøgsdyr, og det er muligt at udføre forsøgene under kontrollerede forhold - tidsrum, stofkoncentration og kontrolforsøg. Modellen giver et direkte indblik i transport og mekanismer i den humane placenta. Dermed kan data fra denne model anvendes direkte som indicium for, hvad der sker under graviditeten. Når der ekstrapoleres fra dyreeksperimentelle studier, er det ofte med et vist forbehold for, om det er de samme mekanismer, man ser i det anvendte forsøgsdyr, som optræder i mennesker, og det er derfor ofte nødvendigt at anvende mange, samt forskellige arter af forsøgsdyr for at få anvendelige data. Anvendelsen af placentae fra kvinder giver mulighed for at se bort fra forskelle i kinetik,

struktur, sensitivitet, gestationslængde og baggrundsniveauer, som varierer arter imellem. Dette giver en større sikkerhed ved risikovurdering.

Mange nye stoffer kommer på markedet, og der er behov for hurtigt at danne sig et billede af disse stoffers reproduktionstoksiske egenskaber. Med udviklingen af en række testsystemer kan industri og lovgivere hurtigere få svar på nogle af de væsentlige spørgsmål omkring potentielt farlige egenskaber af fremmedkemikalier. Dette vil spare tid og forsøgsdyr og på sigt være med til at sikre mindre farlige kemikalier i vores hverdag. Det er vigtigt at fortsætte udviklingen med solide og validerede testsystemer.

Den humane placentaperfusionsmodel bruges til at studere kinetik og metabolisme i den terminale placenta. Der er stort potentiale i at bruge humant væv på denne måde, hvilket har resulteret i international anderkendelse ved priser og fondsmidler.

Yderligere information:  
Line Mathiesen  
[lima@sund.ku.dk](mailto:lima@sund.ku.dk)

---

## Referencer

1. Schmidt A, Morales-Prieto DM, Pastuschek J, Frohlich K, Markert UR. *Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans*. J Reprod Immunol 2015;108:65-71.
2. Mathiesen L, Rytting E, Mose T, Knudsen LE. *Transport of Benzo[alpha]pyrene in the Dually Perfused Human Placenta Perfusion Model: Effect of Albumin in the Perfusion Medium*. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2009:181-7.
3. Morck TJ, Sorda G, Bechi N et al. *Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A*. Reprod Toxicol 2010;30:131-7.
4. Frederiksen M, Vorkamp K, Mathiesen L, Mose T, Knudsen LE. *Placental transfer of the polybrominated diphenyl ethers BDE-47, BDE-99 and BDE-209 in a human placenta perfusion system: an experimental study*. Environ Health 2010;9:32-41.
5. Correia Carreira S, Cartwright L, Mathiesen L, Knudsen LE, Saunders M. *Studying placental transfer of highly purified non-dioxin-like PCBs in two models of the placental barrier*. Placenta 2011:283-91.
6. Myllynen P, Mathiesen L, Weimer M et al. *Preliminary interlaboratory comparison of the ex vivo dual human placental perfusion system*. Reprod Toxicol 2010:94-102.
7. Mathiesen L, Mose T, Morck TJ et al. *Quality assessment of a placental perfusion protocol*. Reprod Toxicol 2010:138-46.
8. Poulsen MS, Mose T, Maroun LL et al. *Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta*. Nanotoxicology 2013;9:79-86.
9. Maroun LL, Mathiesen L, Hedegaard M, Knudsen LE, Larsen LG. *Pathologic evaluation of normal and perfused term placental tissue*. Pediatr Dev Pathol 2014;17:330-8.
10. Hewitt M, Maddn JC, Rowe PH, Cronin MT. *Structure-based modelling in reproductive toxicology: (Q)SARs for the placental barrier*. SAR QSAR Environ Res 2007;18:57-76.
11. Audus KL. *Controlling drug delivery across the placenta*. Eur J Pharm Sci 1999;8:161-5.
12. Poulsen, MS. *In vitro test methods for transport of selected small chemicals and nanoparticles in human placenta models*. 2010. Institute of Public Health, University of Copenhagen. Thesis.
13. Mose T, Mathiesen L, Karttunen V et al. *Meta-analysis of data from human ex-ávivo placental perfusion studies on genotoxic and immunotoxic agents within the integrated European project NewGeneris*. Placenta 2012.
14. Andersen MH. *Placental transport of parabens and analysis of data from human ex vivo placental perfusion studies*. 2015. Thesis.
15. Pedersen M, Halldorsson TI, Mathiesen L et al. *Dioxin-like exposures and effects on estrogenic and androgenic exposures and micronuclei frequency in mother-newborn pairs*. Environ Int 2010;36:344-51.



# Brug af alternative metoder til regulering af kemikalier - muligheder og begrænsninger

Af Magnus Løfstedt, Marie Louise Holmer og Henrik Tyle, Miljøstyrelsen

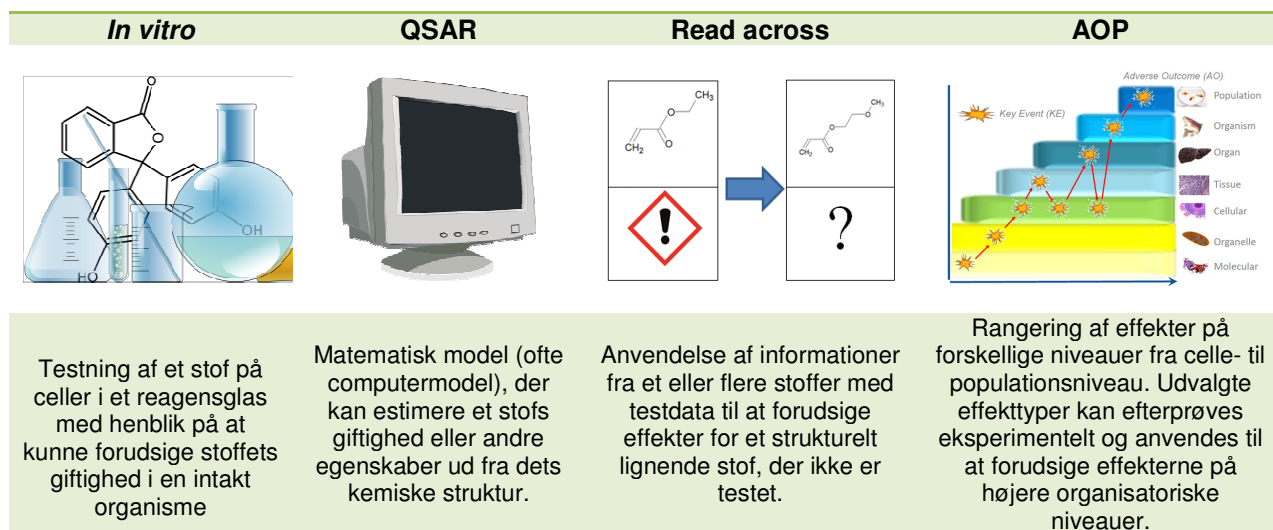
## Baggrund

De fleste af de kemikalier, vi møder i vores omgivelser, er ikke testet for alle typer af skadelige effekter i dyreforsøg. Inden for EU stiller REACH lovgivningen krav om, at industrien selv skal teste de stoffer, de importerer eller producerer. Når der alligevel ofte mangler informationer, hænger det blandt andet sammen med, at der sættes lavere krav til testning af stoffer, der importeres eller produceres i lavere volumener, at visse effekttyper ikke er dækkede af de standardtest, der kræves under REACH, og at stoffer, der tidligere er testet i dyreforsøg, normalt ikke kræves testet igen, selvom en testmetode efterfølgende er blevet

opdateret, så den kan anvendes til at identificere andre typer af effekter end den oprindelig kunne. Endeligt giver REACH lovgivningen også mulighed for, at industrien kan undgå at teste i dyr og i stedet anvende alternative metoder til at udfylde standardinformationskravene, når visse betingelser er opfyldt.

Der er derfor stærke politiske, økonomiske, dyrevelfærdsmæssige og resursemæssige interesser i at udvikle og anvende alternative metoder til vurdering og regulering af kemikalier. Både nationalt og internationalt er en række initiativer i gang for at fremme udvikling og brug af mange forskellige typer af metoder.

## Alternative metoder til forudsigelse af kemikaliers giftighed



Figur 1. AOP er en forkortelse for "Adverse Outcome Pathway" og stort set synonymt med et andet tidligere ofte anvendt begreb, "Mode of Action".

---

## Arbejdet med udvikling af alternative metoder

Der arbejdes systematisk med udvikling af alternative metoder til brug for reguleringsmæssige tiltag, både i OECD og i EU. Miljøstyrelsen deltager aktivt i udviklingsarbejdet og finansierer også særligt prioriterede og målrettede aktiviteter desangående på enkelte universiteter såsom DTU, hvor bl.a. udvikling af den danske QSAR database foregår.

### *OECDs Testguideline Program*

I OECDs Test Guideline Program (TGP) udvikles testmetoder, som anvendes globalt. Testning med en OECD testmetode betyder gensidig accept af data blandt medlemslandene, hvilket betyder, at firmaer ikke behøver teste deres stoffer for de samme effekter i forskellige forsøgsdesigns, alt afhængig af hvor på kloden stofferne anvendes. EUs medlemslande og EU Kommissionen er aktive deltagere i OECDs Test Guideline Program sammen med blandt andet USA, Japan, Sydkorea, Canada og Australien. Også en række ikke OECD lande såsom Brasilien, Rusland og Kina er tilknyttet programmet. En række *in vitro* metoder er udviklet som OECD test guidelines. Det tager ofte flere år at validere, standardisere, kommentere og vedtage metoderne, og bl.a. derfor er der for nylig også udviklet et OECD vejledningsdokument, der beskriver hvordan *in vitro* metoder, der ikke foreligger som OECD test guidelines, kan dokumenteres og dermed bedre vurderes for pålidelighed som forudsætning for deres øgede brug til fare- og risikovurderinger i forhold til reguleringsmæssige tiltag. OECD testguidelines omsættes til EU testmetoder i en særlig Testmetodeforordning for at give dem retligt bindende virkning, f.eks. i forbindelse med testkrav under REACH.

### *AOP og IATA*

I OECD arbejdes også med udvikling af ”Adverse Outcome Pathways” (AOP) og ”Integrated Approaches to Testing and Assessment” (IATA). I AOP arbejdet beskrives, på en syste-

matisk måde for hver enkelt skadelig effekt, den viden, der er om de biologiske mekanismer, der fører til effekten. Tanken er bl.a., at hvis man har tilstrækkelig viden om de tilgrundliggende mekanismer og sammenhænge, kan man bruge data fra et eller flere *in vitro* forsøg til at forudsige den skadelige effekt i dyr eller mennesker. I IATA kombineres alle tilgængelige informationer fra både non-test metoder, *in vitro* metoder og *in vivo* studier, der ikke nødvendigvis alle er dækket af en OECD eller EU testmetode. Den kombinerede brug af metoderne kan reducere usikkerheder ved de enkelte metoder, og IATA kan derfor potentielt medføre, at myndighederne bedre kan acceptere brugen af alternative metoder til erstatning af dyreforsøg. Der mangler dog stadig et stort og givetvis mangeårigt udviklingsarbejde med hensyn til den praktiske udvikling af disse IATA tilgange.

### *OECD QSAR Toolbox*

OECD har desuden udarbejdet en QSAR Toolbox, som er et avanceret IT værktøj til at opstille kategorier eller grupper af stoffer med udgangspunkt i deres struktur, fysisk-kemiske egenskaber og deres effekter *in vitro* og *in vivo*. Den danske QSAR database er indarbejdet i OECD Toolboxen.

### *JRC-ECVAM og PARERE*

I EU arbejder EU Kommissionens rådgivende forskningscenter JRC-ECVAM med udvikling af *in vitro* metoder, QSARs og andre alternative metoder. I forhold til udvikling af *in vitro* metoder har der tidligere været brugt mange ressourcer på at udvikle metoder, der senere viste sig ikke at være egnede til myndigheds-vurdering af kemikalier. Derfor er der udpeget en gruppe af repræsentanter fra EU-medlemslandene (PARERE), som skal rådgive JRC-ECVAM tidligt i processen om den reguleringsmæssige relevans af nye *in vitro* metoder, inden der igangsættes validering af dem.

### *Den danske QSAR database*

Den danske QSAR database blev offentliggjort i 2004, og den er frit tilgængelig på Internettet. I databasen kan man søge efter et konkret stofs

modellerede effekter/egenskaber. Databasen har siden offentliggørelsen på internettet i 2004 været et af de mest omfattende værktøjer i verden til vurdering af kemiske stoffer med manglende eller utilstrækkelige testdata. Databasen anvendes af myndigheder til at identificere potentielt farlige stoffer. Den anvendes også af industrien bl.a. til selvklassificering af deres stoffer og i forbindelse med substitutionsovervejelser, hvor man hurtigt kan screene egnede kandidater for potentielt farlige egenskaber. Den eksisterende QSAR database har

dog ikke været opdateret siden offentliggørelsen og er derfor forældet på visse områder.

En opdateret og forbedret udgave af den danske QSAR database vil blive offentliggjort i efteråret 2015. Denne vil indeholde forudsigelser af en lang række stofegenskaber og effekter (f.eks. kræft, mutagenicitet, hudallergi, hormonforstyrrende effekter) for ca. 600.000 forskellige stoffer. Databasen udvikles af DTU Fødevareinstituttet i samarbejde med Miljøstyrelsen.

The screenshot shows the user interface of the Danish QSAR database. On the left is a sidebar with search filters: 'Id', 'PhysChem', 'Environment', 'ADME', 'Human health', 'Structure', 'AND Intersect results', 'OR Unite results', and 'NOT Complement results'. The main area is titled 'Searches' and shows a search for 'RN: 3380-34-5: Page 1'. It displays the chemical structure of 3,4-dichloro-2,6-dihydroxyacetophenone (3380-34-5) and a 'Download' button. Below the structure are two tables of test results.

**Irritation and Sensitisation**

	Battery	CASE Ultra	Leadscope	SciQSAR
Severe Skin Irritation in Rabbit	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN	NEG_IN
Allergic Contact Dermatitis in Guinea Pig and Human	POS_IN	POS_IN	NEG_IN	POS_IN
Respiratory Sensitisation in Humans	POS_OUT	INC_OUT	POS_OUT	POS_IN

**Endocrine and Molecular Endpoints**

	Battery	CASE Ultra	Leadscope	SdQSAR
Estrogen Receptor $\alpha$ Binding ALL (Human in vitro)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	POS_IN
Estrogen Receptor $\alpha$ Binding BAL (Human in vitro)	INC_OUT	NEG_IN	NEG_OUT	POS_IN
Estrogen Receptor $\alpha$ Activation (Human in vitro)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	POS_IN
Androgen Receptor Antagonism (Human in vitro)	POS_IN	POS_IN	POS_IN	POS_IN
Thyroid Receptor $\alpha$ Binding -log(IC50 in $\mu$ M) (Human in vitro)	-2.521545	-5.204	-2.69239	-2.3507
- domain	IN	AOK	IN	All_TRA.Domain
Thyroid Receptor $\beta$ Binding -log(IC50 in $\mu$ M) (Human in vitro)	-2.44499	-4.51	-1.22557	-1.5994
- domain	IN	AOK	IN	All_TRB.Domain
Pregnane X Receptor (PXR) Binding (human in vitro)	INC_OUT	NEG_IN	NEG_OUT	POS_IN

Figur 2. Betaudgave af den nye danske QSAR database som publiceres i efteråret 2015

---

## Brugen af alternative metoder under REACH

EUs kemikalielovgivning REACH har pålagt den kemiske industri en skærpet forpligtelse i forhold til at teste og dokumentere sikkerheden af de kemikalier, der fremstilles i eller importeres til EU.

REACH har samtidigt indført muligheden for, at industrien kan gøre brug af alternative metoder såsom QSAR og read across, hvilket kan mindske brugen af forsøgsdyr i overensstemmelse med dyrevelfærdshensyn eller de såkaldte 3R principper (Reduction, Refinement & Replacement). Virksomhederne kan også på den måde spare betydelige udgifter til dyreforsøg. En forudsætning for anvendelse af de ”alternative metoder” er ifølge REACH, at denne anvendelse ikke sker på bekostning af beskyttelse af miljø og sundhed, hvilket i praksis kan være en stor udfordring at sikre. REACH kræver nemlig, at anvendelse af metoderne dels kan forsvares videnskabeligt, dels er dokumenteret og endeligt, at beskyttelsesniveauet ikke sænkes derved.

Den hyppigst anvendte metode til erstatning af dyreforsøg under REACH er read across fra et eller flere strukturelt lignende stoffer, som er anvendt i ca. 75 % af registreringsdossiererne. QSAR estimater er også bredt anvendt, men med overvægt for miljøområdet (fysisk-kemiske egenskaber, akut giftighed for vandlevende organismer, nedbrydelighed og bioakkumulerbarhed) og i mindre - men givetvis stigende - grad for visse sundhedseffekter såsom hudallergi. *In vitro* metoder anvendes nu hyppigt for visse effekttyper som f.eks. hud- og øjenirritation, hvor anvendelsen er tredoblet inden for de seneste fire år. Også hudallergi er en effekttype, som i stærkt stigende omfang forventes dækket af AOP relaterede *in vitro* testmetoder og IATA inden for de nærmeste år. Nyere metoder, såsom Adverse Outcome Pathways (AOP) eller Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), har dog endnu ikke fundet bred anvendelse blandt REACH registranterne, men brugen af disse

mere integrerede metoder forventes at stige ved den sidste registreringsdato i 2018 for stoffer, der markedsføres i lave tonnager (1-100 tons / år pr. registrant).

Det Europæiske Kemikalieagentur (ECHA) udgiver en årlig evalueringsrapport for REACH registreringerne. Heri er det flere gange blevet konkluderet, at der generelt er store problemer med registranternes dokumentation for anvendelse af non-test metoder. For at kunne erstatte et dyreforsøg skal de alternative metoder kunne levere samme information/dokumentation, som man ville kunne få fra det tilsvarende dyreforsøg. For visse standard informationskrav under REACH, som f.eks. vedrører reproduktionstoksikologi eller kroniske effekter efter langvarig eksponering, er det på grund af kompleksiteten normalt ikke muligt at kunne dokumentere, at anvendelsen af alternative metoder til erstatning af dyreforsøg er i overensstemmelse med REACH. Derimod er det for eksempel for både visse reproduktionstoksikologiske effekter og mutagene og kræftfremkaldende effekter muligt at rejse meget velbegrundede mistanker alene ved hjælp af de ovennævnte metoder. Dette skyldes, at disse effekttyper kan være udløst af en grundlæggende mekanisme, såsom henholdsvis receptorbinding til kønshormonreceptorer eller induktion af blivende DNA skader, som med stor sikkerhed kan påvises ved hjælp af QSAR forudsigelser og *in vitro* metoder.

### Eksempler på andre anvendelser af alternative metoder

Industrien anvender ofte alternative metoder i forbindelse med REACH registreringer som alternativ til at udføre dyreforsøg. Det er dog også muligt for industrien at anvende disse metoder i udviklingsarbejdet med at finde nye stoffer til substitution af potentielt farlige stoffekandidater med mindre eller ikke farlige kandidater. Myndighederne benytter ofte alternative metoder, som eksempelvis QSAR estimater til at identificere muligt problematiske stoffer. Hermed fokuseres resurserne omkring de stoffer, hvor der med størst sandsynlighed er

---

behov for klassificering & mærkning, yderligere testning og/eller en bedre risikohåndtering.

### *Substitution af farlige stoffer*

Et af de helt store dilemmaer ved substitution af enkeltstoffer er, at man ofte substituerer velkendte ”problemkemikalier” med nyere ikke testede alternativer. Disse alternativer kan i nogle tilfælde have tilsvarende eller helt andre problematiske effekter end de stoffer, de påtænkes at erstatte, uden at dette er kendt, fordi det tager mange år at fremskaffe alle de relevante testdata. Ved at inddrage alternative metoder på et tidligt stadie kan virksomhederne hurtigt vurdere, om det giver mening at investere yderligere resurser i testning og udvikling af et stof til et givent formål ud fra dets estimerede sundheds- og miljømæssige profil.

### *Den vejledende liste til selvklassificering*

Omkring 93.000 af de 100.204 eksisterende stoffer i EU (EINECS-fortegnelsen) har endnu ikke undergået formel EU harmoniseret klassificering. For disse stoffer er det producentens eller importørens ansvar at påføre en korrekt klassificering for stoffernes iboende farlige egenskaber (”selvklassificering”). Imidlertid er der for de fleste af stofferne kun få eller ingen testresultater (fra dyreforsøg m.m.), som kan anvendes i henhold til de kriterier, der er fastsat for klassificering af stoffernes farlighed over for mennesker eller miljø. Som bidrag til at afhjælpe denne datamangel har QSAR gruppen på DTU, finansieret af og i samarbejde med Miljøstyrelsen, ved hjælp af QSAR modeller lavet forudsigelser af en række farlige egenskaber for ca. halvdelen af EINECS<sup>1</sup>-fortegnelsens stoffer, dvs. for 49.292 organiske enkeltstoffer. De forskellige forudsagte farlige egenskaber er så blevet matchet med EUs fareklassificeringsregler, og de heraf fremkomne vurderinger er blevet anvendt til at lave vejledende lister med klassificerings-

forudsigelser, for følgende typer af effekter: 1) skader på arveanlæggene, 2) kræftfremkaldende effekt, 3) reproduktionstoksicitet (skader på udvikling og forplantningsevne), 4) akut dødelig virkning ved indtagelse, 5) hudirritation, 6) allergifremkaldende effekt ved hudkontakt, 7) farlighed for organismer, der lever i vandmiljøet.

Af de 49.292 stoffer har mere end 30.000 stoffer fået vejledende klassificeringer for én eller flere af disse egenskaber. I tilfælde, hvor der ikke findes andre pålidelige oplysninger for et stof, anbefaler Miljøstyrelsen, at de vejledende klassificeringer anvendes i forbindelse med virksomhedernes ”selvklassificering” af de stoffer, som de markedsfører i EU.

### *Identificering af mulige CMR stoffer*

En meget stor andel af industrikemikalierne på markedet i EU har mangelfulde eksperimentelle data. Konsekvensen af dette er, at nogle CMR (Kræftfremkaldende, Mutagene eller Reproduktionstoksiske) stoffer anvendt i EU muligvis ikke er blevet klassificeret for at have sådanne effekter, selvom dette burde være tilfældet. Miljøstyrelsen bruger derfor QSAR modeller til at screene REACH stoffer for potentielle CMR egenskaber. For at øge validiteten af forudsigelserne kombineres flere forskellige modeller for relevante tests i QSAR model algoritmer, der munder ud i overordnede CMR meldinger. Ud af de 70.000 undersøgte stoffer er der cirka 700, som er mistænkte CMR-stoffer, som findes i produkter, som mennesker med sandsynlighed kan komme i kontakt med. Generelt kan resultaterne bruges som et signal til Industrien om, at der kan være behov for fremskaffelse af mere viden for at dokumentere sikker brug (afhængigt af hvilken anden dokumentation, der allerede foreligger). For de stoffer, der er registrerede under REACH, kan en yderligere ekspertvurdering foretages i forbindelse med prioritering af stoffer til yderligere ”stofvurdering” under REACH med henblik på at afklare mistænkte bekymrende effekter.

---

<sup>1</sup> EINECS er EUs liste over de markedsførte stoffer i EU i perioden 1971-1981



---

## Fremtidsudsigter

Udviklingen inden for molekylærbiologi og toksikologi vil fremover bane vejen for også at udvikle bedre alternative metoder til kemikalievurdering. På længere sigt vil farevurdering af kemikalier bevæge sig væk fra forholdsvis simple standardtests med dyr og over imod mere målrettede dyreforsøg, hvor sådanne ikke kan undværes, men derudover også mere imod reagensglasbaserede (*in vitro*) undersøgelser vedrørende kemikaliers virkningsmekanismer. Det forventes også, at read across og QSAR forudsigelser får stigende anvendelse. Processen er allerede i gang, bl.a. i forbindelse med udviklingen af OECD QSAR Toolbox og implementering af AOP og IATA under OECDs Kemikalieprogram og REACH, herunder i forhold til udvikling af nye test guidelines og eksempelsamlinger samt vejledninger vedrørende brug af IATA for forskellige effektområder. Det vurderes dog også, at det realistisk set vil tage mange år, før de alternative metoder er gode nok til fuldt ud at kunne erstatte dyreforsøg. Inden for visse effekttyper (f.eks. hudallergi) er der allerede nu lovende AOP relaterede *in vitro* metoder under udvikling, mens det for andre effekttyper (f.eks. kroniske effekter efter lang tids eksponering) har lange udsigter. Endeligt er det allerede nu, eller inden for en overskuelig årrække, muligt at identificere stoffer, der på grund af særlige virkningsmekanismer med stor sikkerhed må forventes at have specielle skadelige effekter (f.eks. genotoksiske stoffer, kræftfremkaldende stoffer og reproduktionstoksiske stoffer med anti-androgene, østrogene eller visse specifikke teratogene virkningsmekanismer).

Yderligere information:  
Magnus Løfstedt  
[malfs@mst.dk](mailto:malfs@mst.dk)

## Foredrag om imprægneringssprayprodukter

På temadagen holdt seniorforsker Søren Thor Larsen fra Det Nationale Forskningscenter et indlæg om toksiske effekter af imprægneringssprayprodukter.

Søren Thor Larsen har tidligere skrevet en artikel "Toksiske effekter af imprægneringssprayprodukter" i "miljø og sundhed" nr. 3. december 2014, som der henvises til.

<http://miljoogsundhed.sst.dk/blad/ms1403.pdf>







Skriv til **miljø og sundhed**

skriv om forskningsresultater

skriv til synspunkt

skriv et mødereferat

send nye rapporter

husk også kalenderen

Ring, skriv eller send en e-mail til:

Hilde Balling  
Sundhedsstyrelsen  
Axel Heides Gade 1  
2300 København S  
tlf. 72 22 74 00, lokal 77 76  
fax 72 22 74 11  
e-mail [hib@sst.dk](mailto:hib@sst.dk)

<http://miljoogsundhed.sst.dk>

også hvis du bare har en god idé!