

Valutazione del rischio chimico

CdL Magistrale Interateneo in
Analisi e Gestione Ambientale
Università di Udine e Università di Trieste

CdL Magistrale in Chimica
Università di Trieste

Docente
Pierluigi Barbieri

SSD Chimica dell'ambiente e dei beni culturali, CHIM/12

Valutazione del rischio chimico

Processo chimico



(Emissioni)



*(Dispersione
Trasferimenti di fase
trasformazioni ambientali)*



Esposizione / PEC



***Valutazione
del rischio***

*Valutazione degli **effetti** dell'esposizione
a sostanze singole e a miscele /
NOAEC /tossicologia*



Valutazione della tossicità per la valutazione del rischio per la salute umana (RAoC cap.6)

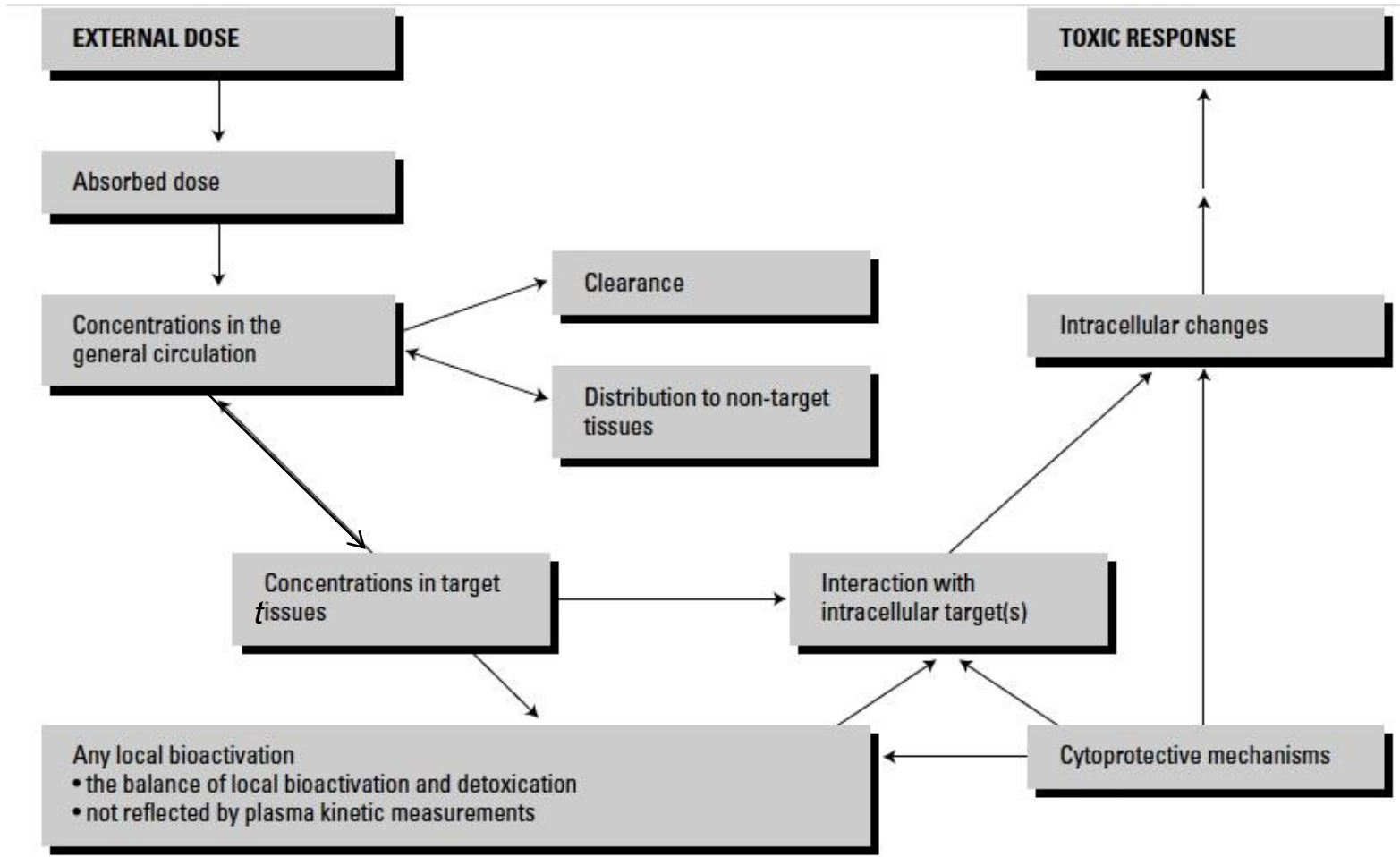


Figure 6.1. Processes leading to the generation of a toxic response [2].
 Note: "Concentrations" refers to the relevant active form delivered by the general circulation and may be the parent compound or an active metabolite produced in another tissue and delivered to the target tissue or organ

S. Manahan "Toxicological Chemistry and Biochemistry"

CRC press (2003)

Capitoli 6-7 per generalità

+ c. 10-19 per chimica tossicologica di specifiche sostanze chimiche



The image shows a Google search interface. The search bar contains the text "toxicological chemistry and biochemistry". Below the search bar, there are navigation tabs for "Web", "Immagini", "Shopping", "Maps", "Notizie", "Altro", and "Strumenti di ricerca". The "Web" tab is selected. Below the tabs, it says "Circa 24.900.000 risultati (0,49 secondi)". There are two search results displayed. The first result is titled "Articoli accademici per toxicological chemistry and biochemistry" and lists several articles with their authors and citation counts. The second result is a PDF titled "toxicological chemistry and biochemistry - third edition" from a website, with a snippet of text and a date of 21/04/15.

GOOGLE toxicological chemistry and biochemistry

Web Immagini Shopping Maps Notizie Altro ▾ Strumenti di ricerca

Circa 24.900.000 risultati (0,49 secondi)

Articoli accademici per toxicological chemistry and biochemistry

Toxicological chemistry and biochemistry - Manahan - Citato da 237
... insecticides: chemistry, biochemistry, and toxicology. - Kuhr - Citato da 374
... chemistry of cigarette smoke and its toxicological ... - Church - Citato da 1290

[PDF] toxicological chemistry and biochemistry - third edition
cdn.preterhuman.net/.../Biochemistry/Toxicological%20Chemistry%20an... ▾
Toxicological chemistry and biochemistry / by Stanley E. Manahan. ... The first edition of Toxicological Chemistry (1989) was written to bridge the gap between.
Hai visitato questa pagina in data 21/04/15

Tossicità è la capacità di una specie chimica di provocare danno ad un organismo

In teoria, piccole dosi possono esser tollerate in considerazione della presenza di sistemi fisiologici di **omeostasi** (la capacità di mantenere stabilità fisiologica e psicologica) e **compensazione** (l'adattamento fisiologico e psicologico): detossificazione metabolica, adattamento e riparazione cellulare.

Al di sopra di **soglie di concentrazione/dose** per ciascuna specie chimica la capacità dell'organismo di compensare a stress tossici viene saturata, deviando dall'omeostasi e portando ad **effetti avversi, reversibili o irreversibili**, fino ad esiti letali.

La via (route), la durata e la frequenza dell'esposizione umana ad una sostanza dovrebbero esser un fattore principale nella valutazione dei pericoli; pericoli che non si manifestano per un modo d'esposizione possono diventare evidenti per un altro.

Nella valutazione degli effetti, è necessario **distinguere tra effetti avversi e non** ed associare l'entità dei danni all'esposizione; es dosi ripetute, **studi caso-controllo** ; *cambiamenti statisticamente significativi* o **“serio danno alla salute”?**

DAL NORMALE ALLA PATOLOGIA

OMEOSTASI
(Normale)

Piccolissime e continue modificazioni morfofunzionali in risposta a richieste e stimoli esterni o interni alla cellula stessa

ADATTAMENTO
CELLULARE
(Atrofia, Ipertrofia, Iperplasia)

Modificazioni morfofunzionali con cui la cellula risponde a stimoli fisiologici eccessivi o a particolari stati patologici

DANNO CELLULARE

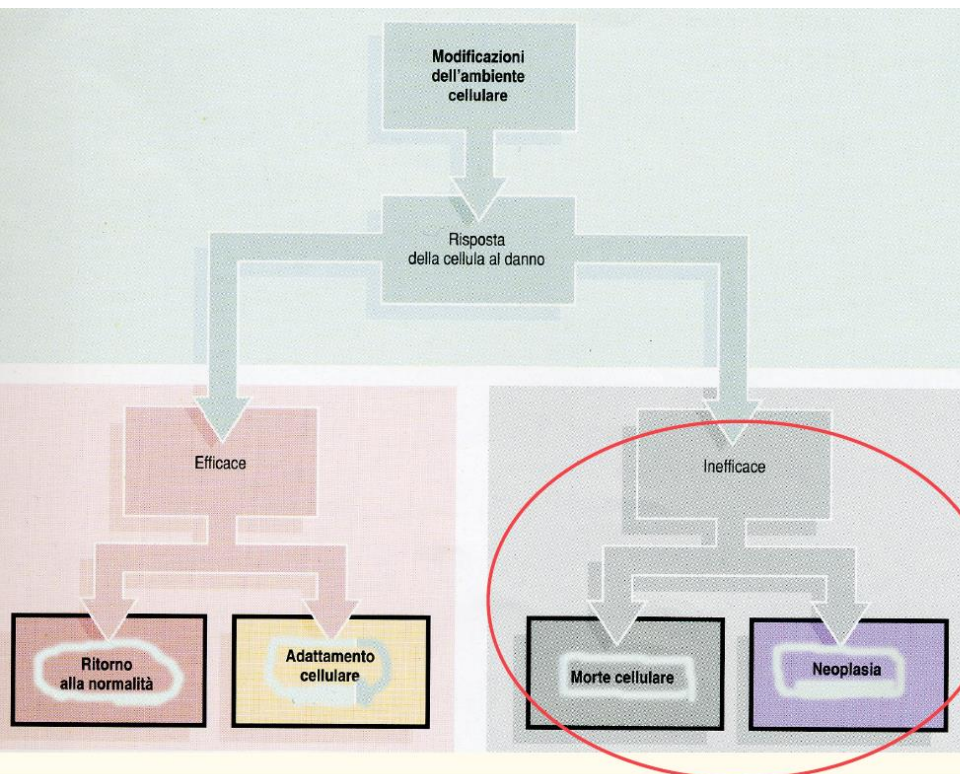
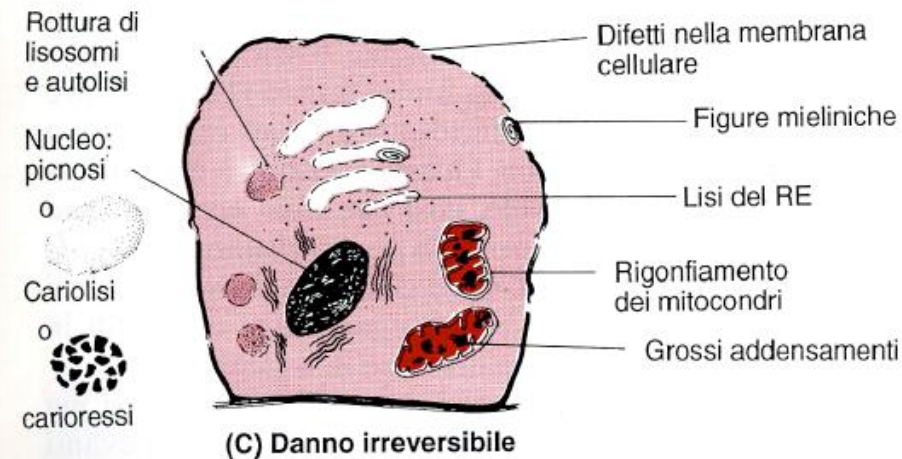
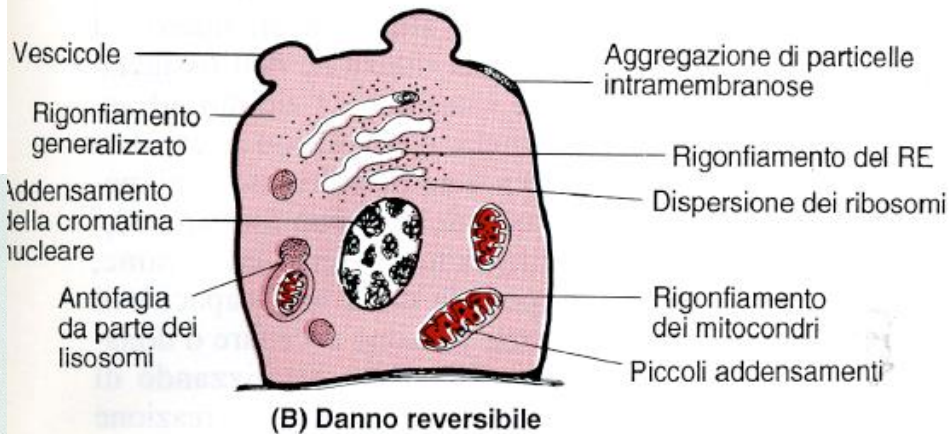
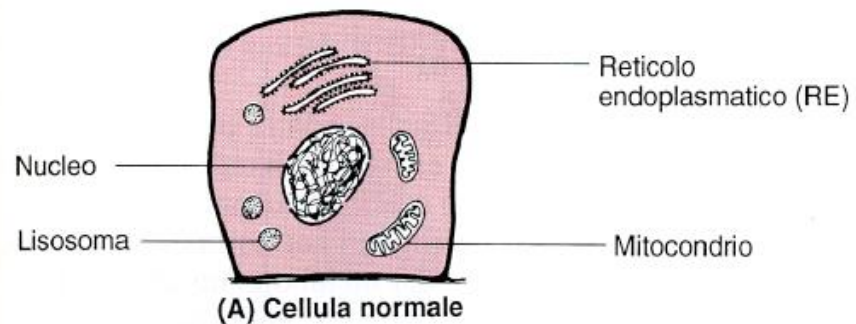
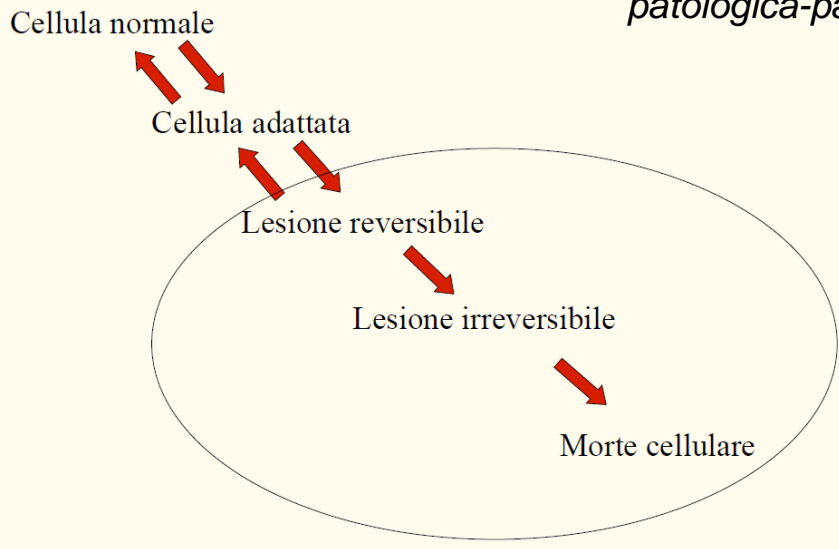
Modificazioni che si verificano nella cellula o nei tessuti in seguito a stimoli che ne superano le capacità adattative.

Reversibile

Irreversibile

DANNO CELLULARE

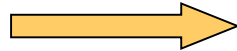
- 1° Molecolare
- 2° Biochimico-funzionale
- 3° Ultrastrutturale
- 4° Microscopico
- 5° Macroscopico



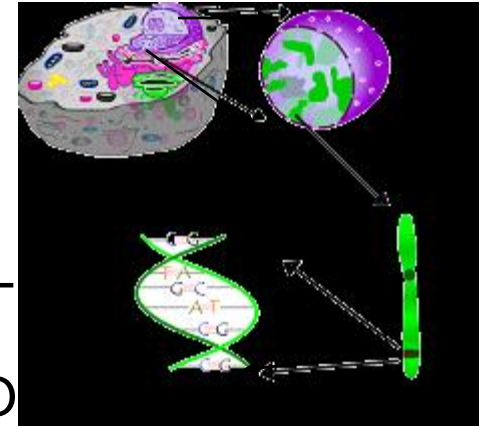
the question which should be asked is: at what dose or concentration does the substance cause “serious damage to health”? According to the guidance provided by the EC serious damage to health is considered to include death, clear functional disturbance or morphological changes which are toxicologically significant. Irreversibility of lesions is a key factor in this assessment. The response of cells and tissues to chemical injury at the intracellular level, i.e., biochemical, functional, and structural changes, or extracellular level, i.e., metabolic and regulatory changes, can be categorized as either degeneration, inflammation or proliferation.

Test della Cometa (SCGE)

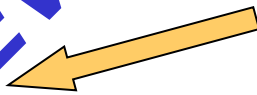
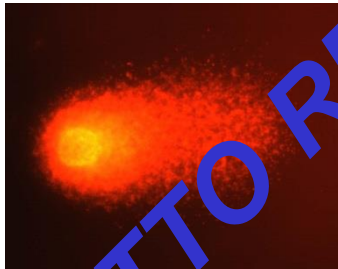
PRINCIPIO



LE ROTTURE DEL
FILAMENTO DEL
DNA SI POSSONO
EVIDENZIARE
TRAMITE
L'ELETTROFORESI



OSSERVAZIONE AL
MICROSCOPIO A
FLUORESCENZA



EFFETTO REVERSIBILE

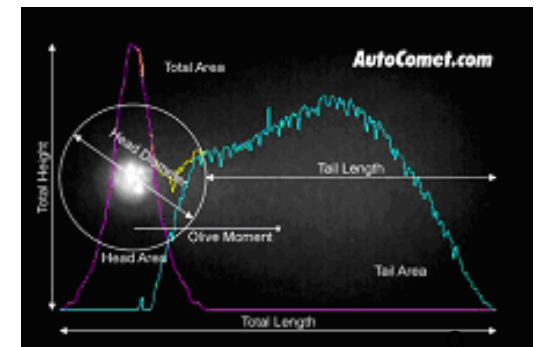


Table 6.1 Ranking of physiological and pathological effects in order of severity

Effect	Severity
Biochemical/haematological change with no pathological change and no change in organ weight; or a change in organ weight with no pathological and biochemical/haematological change	least severe
Biochemical/haematological change with no pathological change and with a change in organ weight	
Enzyme induction and subcellular proliferation or other changes in organelles but no other apparent effects	
Biochemical/haematological change with slight pathological changes	
Hyperplasia, hypertrophy or atrophy with change in organ weight	
Reversible cellular changes: cloudy swelling, hydropic change or fatty changes	
Necrosis, or metaplasia with no apparent reduction in organ functions; any neuropathy without apparent behavioral, sensory, or physiological changes	
Necrosis, atrophy, hypertrophy, or metaplasia with a detectable reduction in organ functions; any neuropathy with a measurable change in behavioral, sensory, or physiological activity; reduced body weight gain; clinical symptoms	
Necrosis, atrophy, hypertrophy, or metaplasia with definitive organ dysfunction; any neuropathy with gross changes in behavioral, sensory, or motor performance	
Pronounced pathological changes with severe organ dysfunction; any neuropathy with loss of behavioral or motor control or loss of sensory ability	
Death or pronounced life-shortening	most severe



Serve valutazione di fisiologo o tossicologo esperto per stabilire se c'è "serio danno alla salute"?

Table 6.1 Ranking of physiological and pathological effects in order of severity

Effect	Severity
Biochemical/haematological change with no pathological change and no change in organ weight; or a change in organ weight with no pathological and biochemical/haematological change	least severe
Biochemical/haematological change with no pathological change and with a change in organ weight	
Enzyme induction and subcellular proliferation or other changes in organelles but no other apparent effects	
Biochemical/haematological change with slight pathological changes	
Hyperplasia, hypertrophy or atrophy with change in organ weight	
Reversible cellular changes: cloudy swelling, hydropic change or fatty changes	
Necrosis, or metaplasia with no apparent reduction in organ functions; any neuropathy without apparent behavioral, sensory, or physiological changes	
Necrosis, atrophy, hypertrophy, or metaplasia with a detectable reduction in organ functions; any neuropathy with a measurable change in behavioral, sensory, or physiological activity; reduced body weight gain; clinical symptoms	
Necrosis, atrophy, hypertrophy, or metaplasia with definitive organ dysfunction; any neuropathy with gross changes in behavioral, sensory, or motor performance	
Pronounced pathological changes with severe organ dysfunction; any neuropathy with loss of behavioral or motor control or loss of sensory ability	
Death or pronounced life-shortening	most severe

valutazione di fisiologo o tossicologo esperto per stabilire se c'è "serio danno alla salute"

(Ana)plasia - indifferenziazione
(Iper)plasia - proliferazione con corredo genetico fisiologico
(Neo)plasia - proliferazione con corredo genetico patologico
(Dis)plasia - anormale maturazione
(Meta)plasia - conversione di tipo cellulare

ipertrofia - aumento del volume delle cellule che compongono un tessuto o un organo.
atrofia - riduzione della massa dei tessuti ed organi causata dalla diminuzione del numero di cellule o delle loro dimensioni

TOSSICOLOGIA – INTRODUZIONE

Veleno o tossico: sostanza che è dannosa a organismi viventi a causa di effetti su tessuti, organi o processi biologici.

La **Tossicologia** è la scienza di agenti tossici/veleni.

Tipo di organismo/quantità di sostanza/ via di esposizione

Tossicologia Moderna M.J.B. Orfila (Minorca 1787-1853)

T. Umana

LD₅₀ Mortalità / Morbilità / dose minima / latenza /

t. acuta / t. cronica

t. genetica (es. nitriti e NADH-metemoglobin-riduttasi)

T. Clinica / T. forense / T. ambientale

(ecotossicologia se studio sorgenti-trasporto-dinamiche di popolazioni)

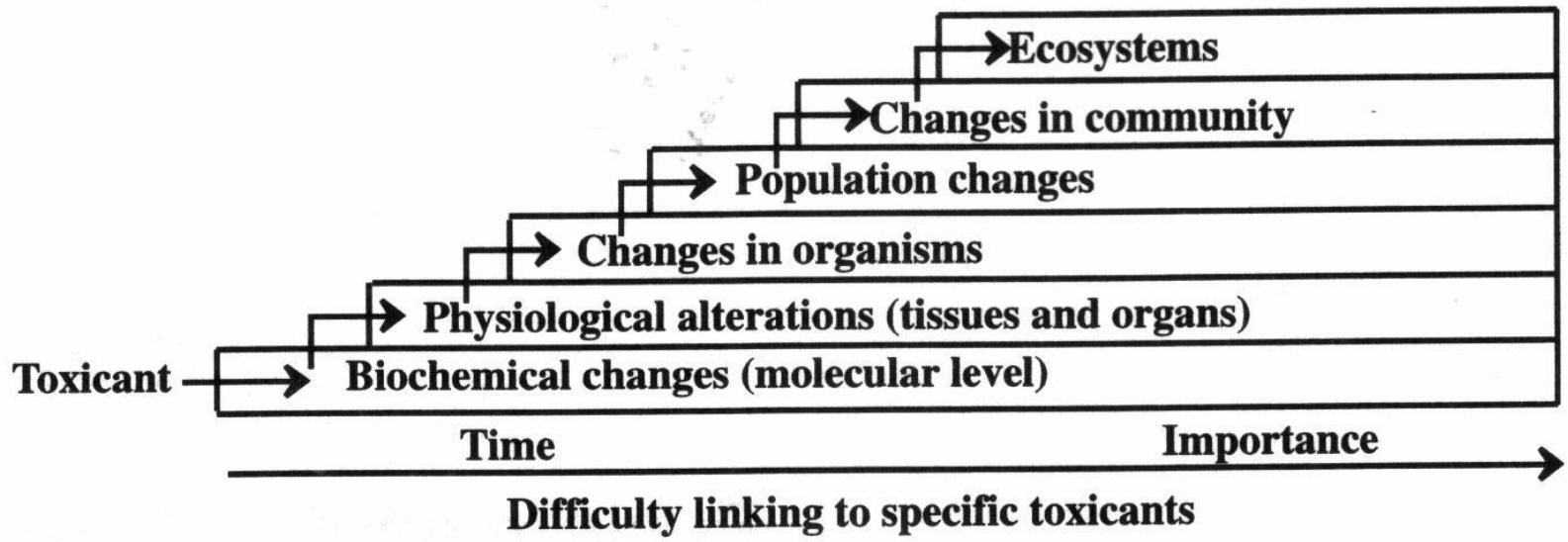


Figure 5.1 Responses to toxicants at different organizational levels in life systems.

Chimica Tossicologica

Connette la Chimica alla Tossicologia: tratta

- la natura chimica delle sostanze tossiche
- le loro trasformazioni biochimiche
- come le sostanze xenobiotiche e i loro metaboliti reagiscono biochimicamente in un'organismo per esercitare l'effetto tossico



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



**Scuola di specializzazione (DM 68/2015) 4 anni
in FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA CLINICA
(non medici)**

FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA CLINICA

anni di corso: 4

posti disponibili: 12

Sono ammessi al concorso i laureati magistrali in: Biologia (Classe LM6) in possesso dell'esame di stato di Biologo, Biotecnologie mediche, veterinarie e farmaceutiche (Classe LM9), Biotecnologie industriali (LM8), Biotecnologie agrarie e per alimenti (Classe LM7), Medicina veterinaria (Classe LM42) in possesso dell'esame di stato di Veterinario, Farmacia e Farmacia Industriale (Classe LM13) in possesso dell'esame di stato di Farmacista, Chimica (Classe LM54) in possesso dell'esame di stato di Chimico, nonché i corrispondenti laureati quadriennali del vecchio ordinamento nelle lauree di Medicina veterinaria, Scienze biologiche, Farmacia, Chimica, Chimica e tecnologia farmaceutica con il corrispondente esame di stato.

Tossicologia – tipi di **SOSTANZE TOSSICHE**

s.t. in molte forme e da molte **fonti**

Fonti naturali -> tossine (*toxins*)

Fonti antropiche -> tossici (*toxicants*)

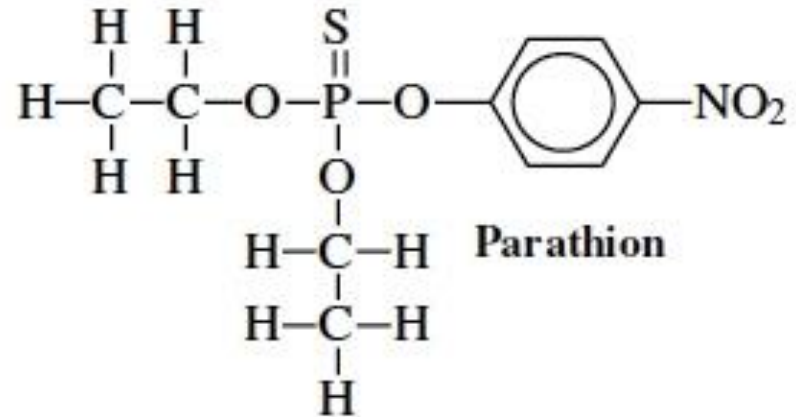
CRITERI DI CLASSIFICAZIONE:

- **Chimici** (es. metalli pesanti, IPA, alcuni di essi cancerogeni)
- **Forma fisica** (es. polveri, vapori, liquidi idrofobi)
- **Sorgenti** (es. tossine vegetali, sottoprodotti da combustione, rifiuti petrolchimici pericolosi)
- **Uso** (es. pesticidi, prodotti farmaceutici, solventi)
- **Organo o tessuto bersaglio** (es. neurotossine o *endocrine disruptors*)
- **Effetti biochimici** (es. legame ed inibizione a enzimi, conversione di emoglobina in metemoglobina)
- **Effetti sugli organismi** (es. cancerogenesi o inibizione del sis. immunitario)

Es. di criteri multipli di classificazione

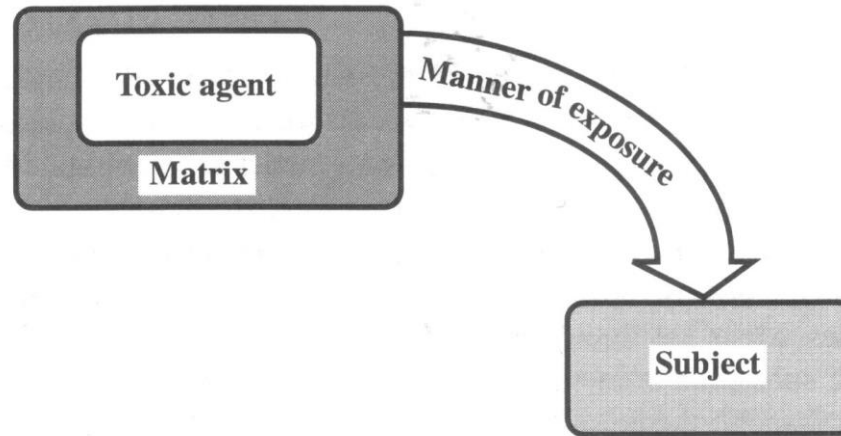
Parathion (bandito negli USA nel 1991, EU 2002, per la tossicità acuta per gli esseri umani).

- O,O-dietil-O-p-nitrofenil tiofosfato



- è un insetticida
- prodotto industrialmente,
- l'esposizione può manifestarsi come una nebbia da spray
- lega all'enzima acetilcolinesterasi,
- ha effetto sulla funzione del sistema nervoso

Tossicologia – fattori che influenzano la tossicità



Toxicity is influenced by the nature of the toxic substance and its matrix, the subject exposed, and the conditions of exposure.

- La sostanza tossica e la sua matrice (BaSO_4 , assorbimento di composti acidi)
- Circostanze di esposizione
- Il soggetto ed il suo ambiente

Forme della sostanza tossica e la sua matrice

Esposizione ambientale ed occupazionale:

tossici in forme diverse

Gas (CO)

Vapori (benzene e naftalene)

Polveri (*dusts* solidi respirabili da macinazione di solidi)

Fumi (da condensazione di vapori)

Nebbie (goccioline di liquido)

Tossico è in genere in soluzione o miscelato: le sostanze con cui è associato costituiscono la **matrice**, che può avere un forte effetto sulla tossicità (es. pH, es: BaSO_4 , BaCl_2)

Executive summary:

Read-across BaCl_2 to BaSO_4 :

The toxicity of barium sulfate and barium chloride is based on the concentration of dissolved Ba^{2+} and therefore on the water solubility of each substance. Barium chloride is known to be well water soluble whereas barium sulfate is low soluble in water. The conclusion is that Ba^{2+} ions are more bioavailable if BaCl_2 is administered as if BaSO_4 is administered. Hence, read across to BaSO_4 based on worst case consideration and will likely lead to rather conservative no-effect levels.

Due to the fact that Barium chloride seems to be no toxic via the dermal route it can be concluded that barium sulfate has a dermal LD50 of >2000 mg/kg bw and should therefore not classified as acute toxic to the dermal route.

<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15235/7/3/4>

Formulato

Nei prodotti commerciali non si hanno sostanze chimiche in purezza, ma dei preparati, composti secondo una determinata formula

Veicolo (soluzione salina, oli vegetali, DMSO, gomme naturali e metil-cellulosa colloidale)

Eccipiente (consistenza e forma)

Coadiuvante (potenzia effetti-es. fungicidi ditiocarbammici potenziati da mercaptotiazoli)

Diluenti

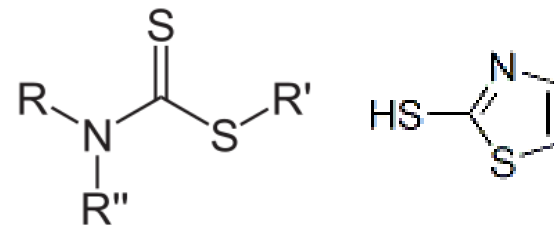
Conservanti (es. antiossidanti)

Lubrificanti

Agenti di rivestimento

Es. prodotto verniciante contiene un legante polimerico, un mezzo solvente e/o disperdente, un pigmento ed eventualmente cariche, additivi vari

Stabilità e caratteristiche di conservazione / decomposizione



Circostanze di esposizione

Modi in cui gli organismi sono esposti dipendono da:

- Dose

Concentrazione del tossico

- Durata e frequenza dell'esposizione

Tasso (*rate*)

- Sito e via (*route*) di esposizione

Esposizione

Acuta locale	Acuta sistemica
Cronica locale	Cronica sistemica

e. sistemica colpisce organi lontani
dal sito di contatto nell'organismo

Il soggetto ed il suo ambiente

Fattori inerenti al soggetto che influenzano risposte a tossici

- Classificazione tassonomica (specie e varietà)
- Caratteristiche genetiche (intraspecifiche)
- Massa corporea, età, sesso, grado di maturità
- Stato immunologico
- Benessere (dieta, idratazione, malattie e ferite, stato psicologico, affollamento o deprivazione, riposo, stress)

Fattori ambientali

- T, P, umidità, composizione dell'atmosfera
- Luce e rumore
- Condizioni sociali e di alloggiamento

Tossicologia – esposizione alle sostanze tossiche

Esposizione:

- percutanea
- polmonare
- tratto gastro-intestinale
 - bocca / esofago / stomaco
 - intestini
 - tratto intestinale e fegato

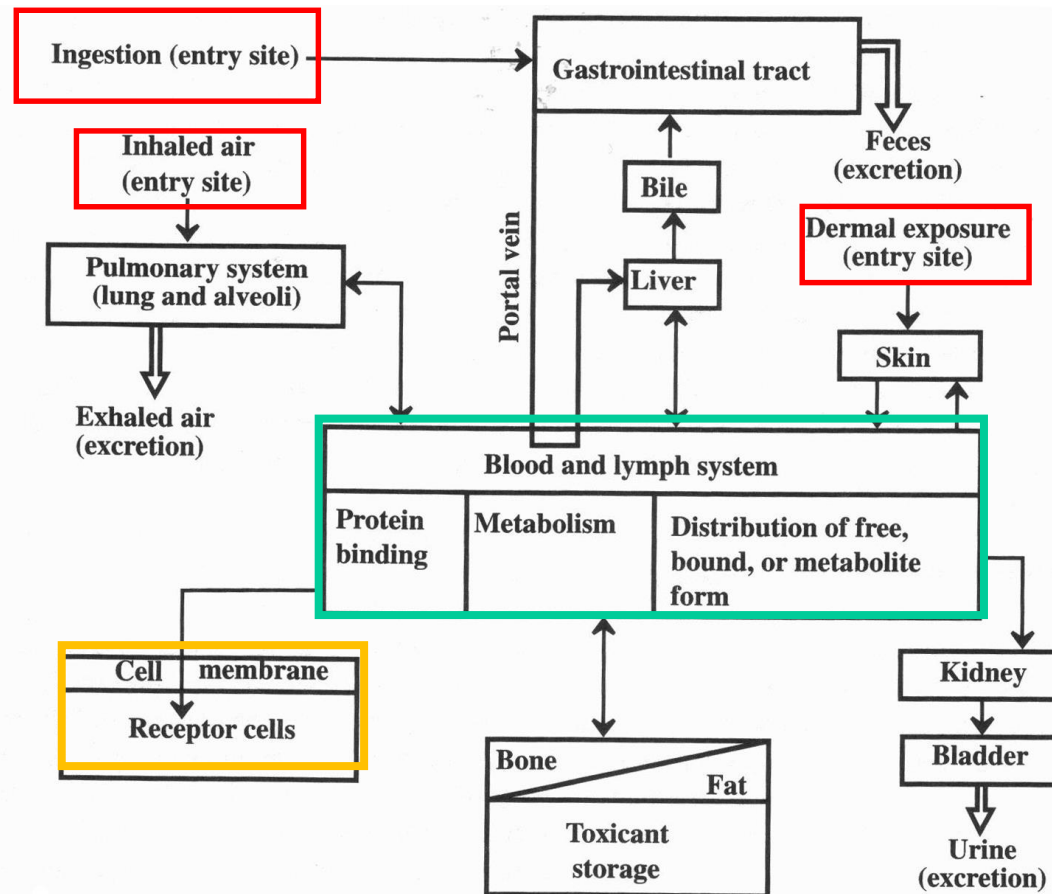
Toxicological Chemistry and Biochemistry – S.E. Manahan, 2003

Health Risk Assessment Dermal and Inhalation Exposure and Absorption of Toxicants

Rhoda G.M. Wang, James B. Knaak, Howard I. Maibach

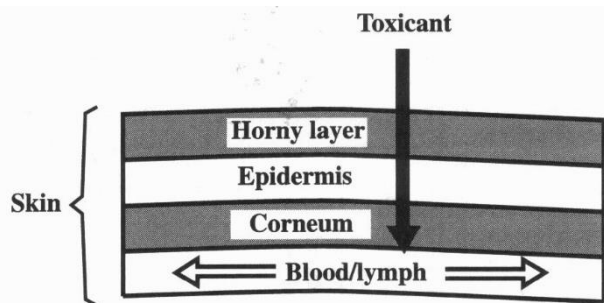
CRC Press, 22 nov 2017 - 544 pagine <https://books.google.it/books?id=J-5HDwAAQBAJ>

Tossicologia – esposizione alle sostanze tossiche



Major sites of exposure, metabolism, and storage, and routes of distribution and elimination of toxic substances in the body.

Tossicologia – esposizione percutanea alle sostanze tossiche



Absorption of a toxic substance through the skin.

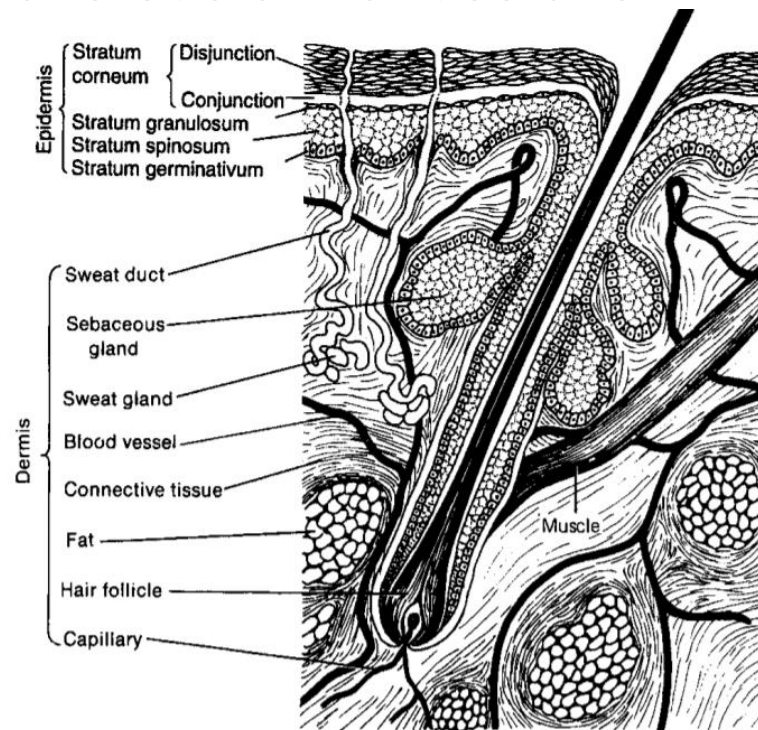


Figure 5-5. Diagram of a cross section of human skin.

Unclassified

ENV/JM/MONO(2011)36

Organisation de Coopération et de Développement Économiques
Organisation for Economic Co-operation and Development

18-Aug-2011

English - Or. English

ENVIRONMENT DIRECTORATE
JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND
THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY

www.olemiss.edu/courses/phcl675/gentox2.pdf

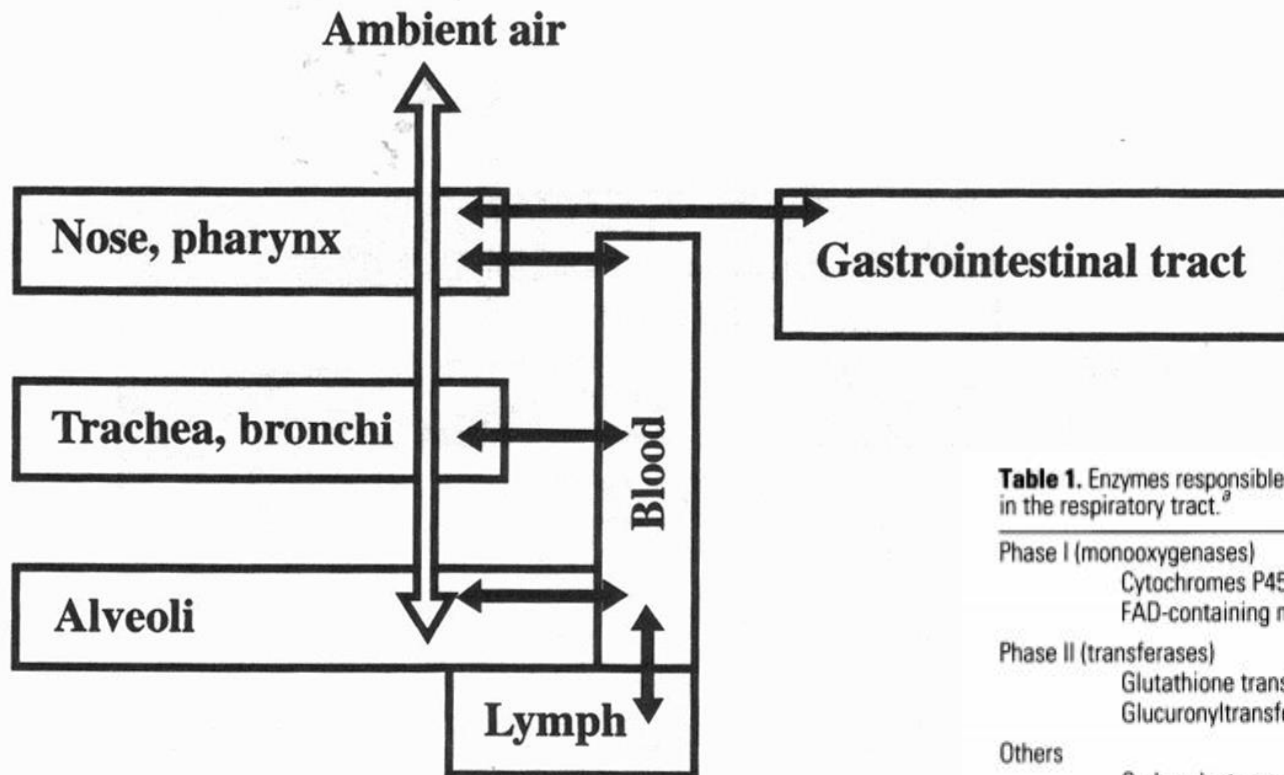
GUIDANCE NOTES ON DERMAL ABSORPTION

Series on Testing and Assessment

No. 156

OECD Guidance notes on dermal absorption
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>

Tossicologia – esposizione polmonare alle sostanze tossiche (scavalca fegato)



Pathways of toxicants in the respiratory system.

Table 1. Enzymes responsible for xenobiotic metabolism in the respiratory tract.^a

Phase I (monooxygenases)	Cytochromes P450 FAD-containing monooxygenase
Phase II (transferases)	Glutathione transferases Glucuronyltransferases
Others	Carboxylesterases Aldehyde dehydrogenase Alcohol dehydrogenase Rhodanese Epoxide hydrolase DT-diaphorase

<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/pdf/10.1289/ehp.94102s1167>

“Uptake and Metabolism of Toxicants in the Respiratory Tract” A.R. Dahl and P. Gerde

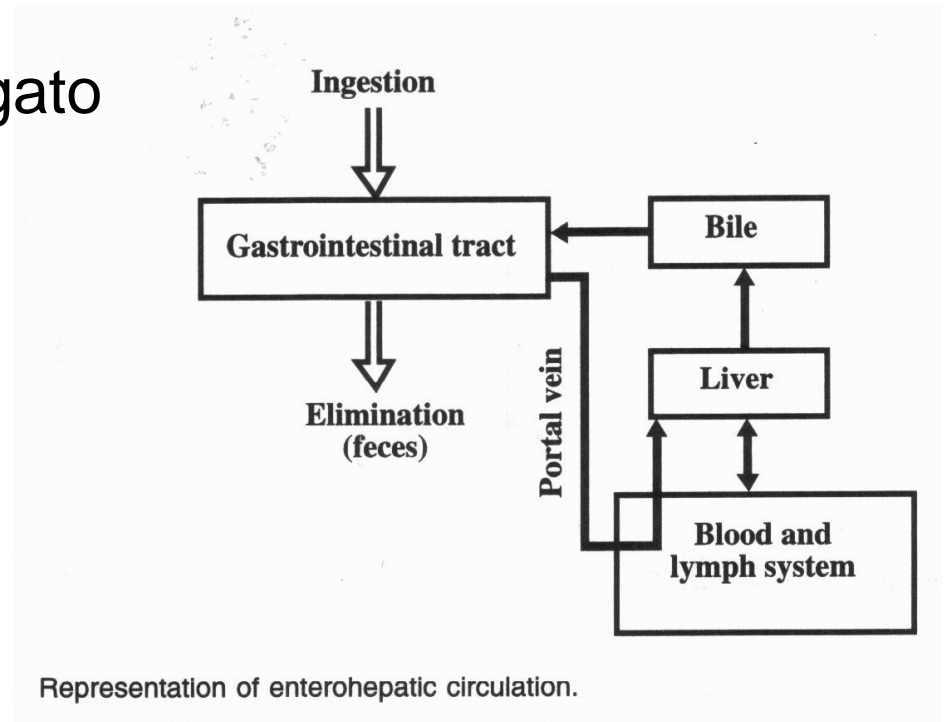
Tossicologia – esposizione alle sostanze tossiche

tratto gastrointestinale

bocca esofago stomaco

intestini

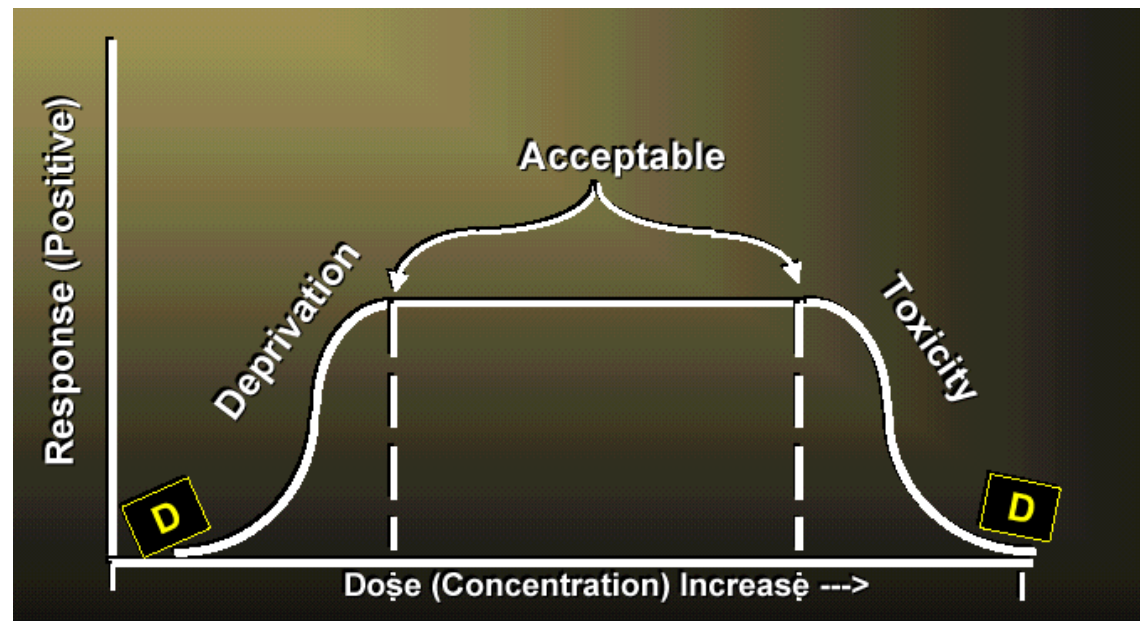
tratto intestinale e fegato



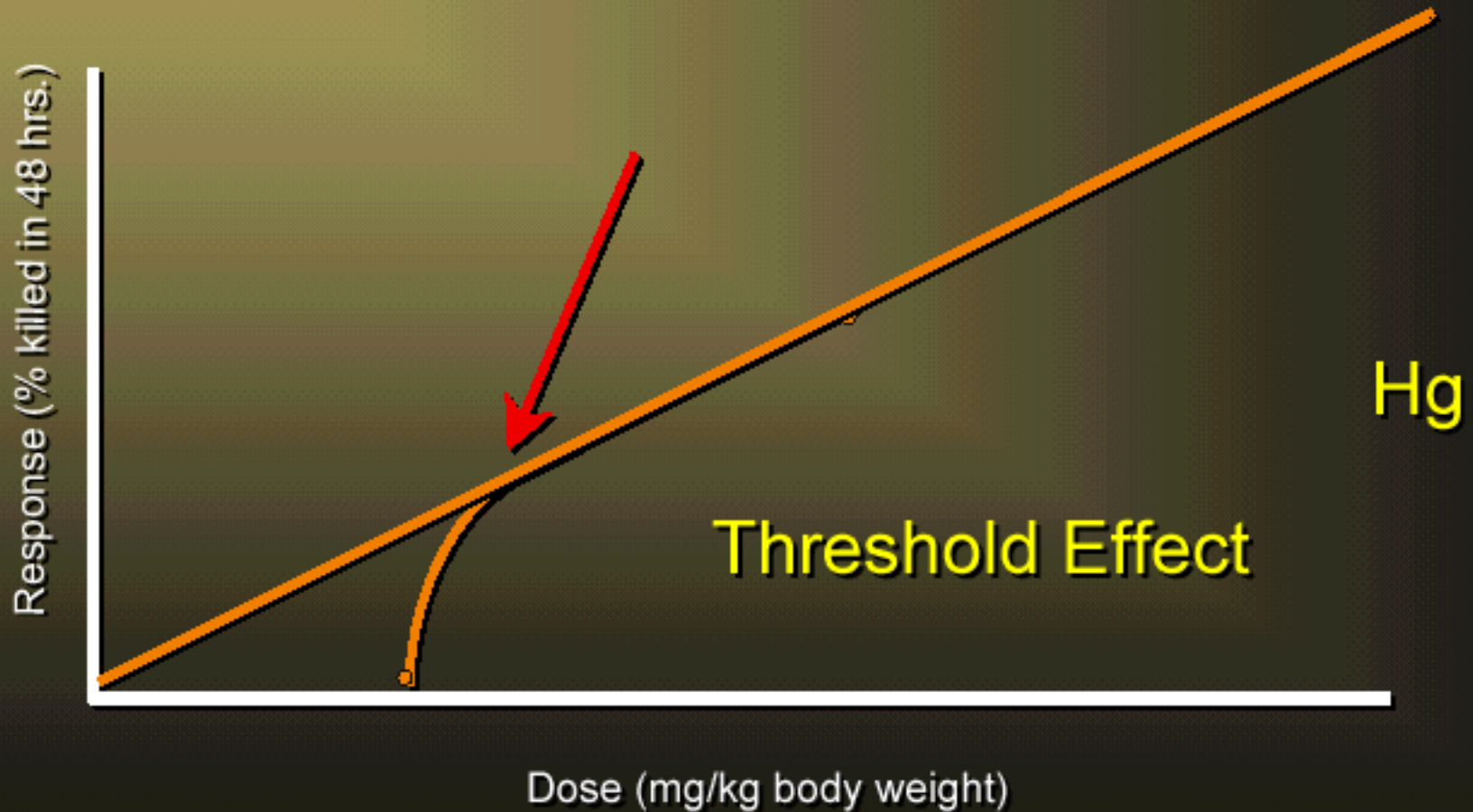
Tossicologia – relazioni dose risposta

- a) Livello minimo d'effetto,
- b) sensibilità di organismo a incrementi di tossico e
- c) livelli per cui effetto definitivo (morte) accade per la maggior parte di organismi esposti.

Per nutrienti minerali esistono range ottimali



Pieces of the Total Dose Response Curve



Tossicologia – relazioni dose risposta

Relazioni dose-risposta

Risposta fisiologica rilevata

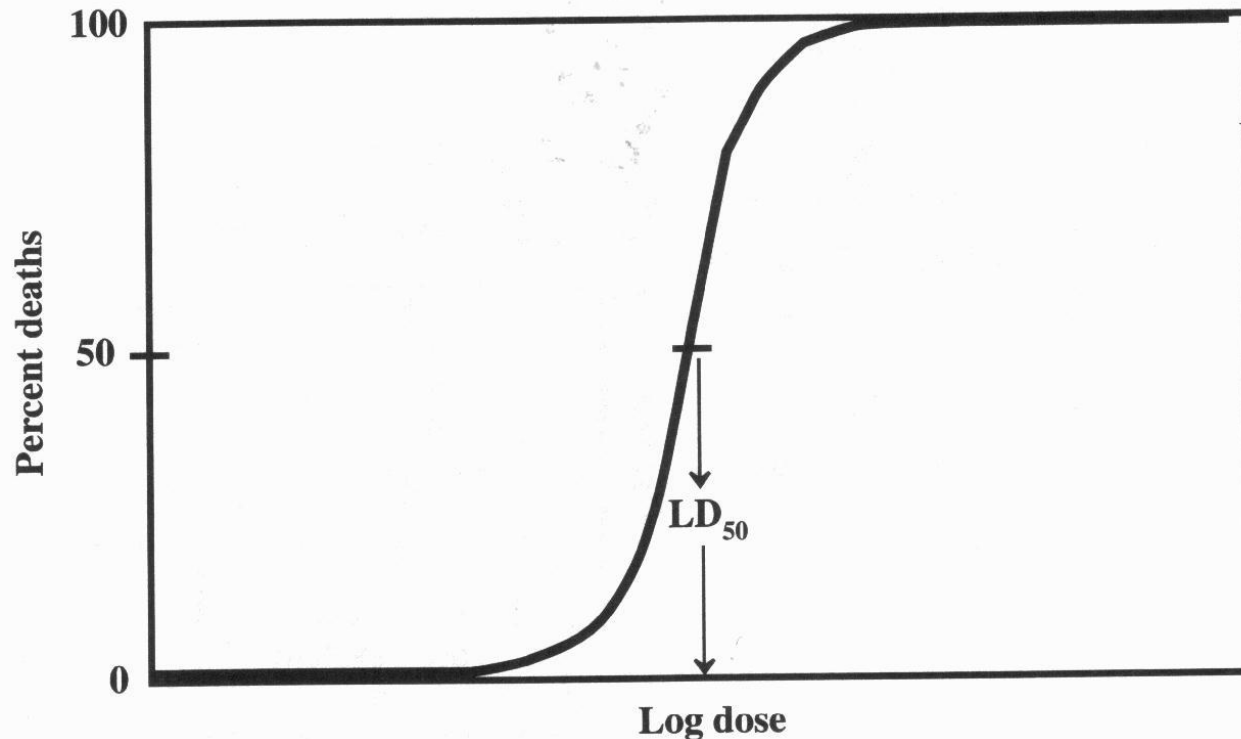


Illustration of a dose–response curve in which the response is the death of the organism. The cumulative percentage of deaths of organisms is plotted on the y axis. Although plotting log dose usually gives a better curve, with some toxic substances it is better to plot dose.

Tossicologia – tossicità relative

Dose letale stimata

per umani (in mg/kg)

(considera però

anche effetti non letali)

Tossicità acuta

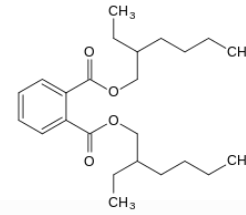


Table 6.1 Toxicity Scale with Example Substances^a

Toxic Substance	Approximate LD ₅₀	Toxicity Rating
DEHP ^b	— 10 ⁵	1. Practically nontoxic, > 1.5 × 10 ⁴ mg/kg
Ethanol	— 10 ⁴	
Sodium chloride	— 10 ³	2. Slightly toxic 5 × 10 ³ – 1.5 × 10 ⁴ mg/kg
Malathion	— 10 ³	
Chlorane	— 10 ²	3. Moderately toxic 500–5000 mg/kg
Heptachlor	— 10 ²	
Parathion	— 10	4. Very toxic 50–500 mg/kg
TEPP ^c	— 1	
Nicotine	— 1	5. Extremely toxic 5–50 mg/kg
Tetrodotoxin ^d	— 10 ⁻¹	
	— 10 ⁻²	6. Supertoxic <5 mg/kg
TCDD ^e	— 10 ⁻³	
	— 10 ⁻⁴	
Botulinus toxin	— 10 ⁻⁵	

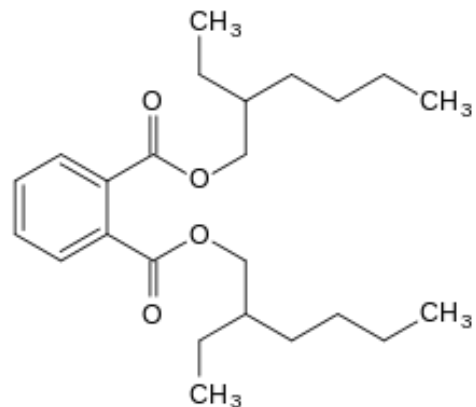
^a Doses are in units of mg of toxicant per kg of body mass. Toxicity ratings on the right are given as numbers ranging from 1 (practically nontoxic) to 6 (supertoxic), along with estimated lethal oral doses for humans in mg/kg. Estimated LD₅₀ values for substances on the left have been measured in test animals, usually rats, and apply to oral doses.

^b Bis(2-ethylhexyl)phthalate.

^c Tetraethylpyrophosphate.

^d Toxin from pufferfish.

^e TCDD represents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin, commonly called “dioxin.”



https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dehp_echa_review_report_2010_6_en.pdf/ce8e254f-3371-4c8b-8b92-865962bc5424

Reproductive toxicant category 1B adverse effects on sexual function and fertility or on development (Table 3.1) or reproductive toxicant category 2 with R60 (May impair fertility) or R61 (May cause harm to the unborn child) (Table 3.2) listed in Appendix 6

Tossicologia – tossicità relative

paragone tra criteri di tossicità acuta

La tossicità acuta si riferisce agli effetti avversi che si verificano in breve tempo (di solito entro 14 giorni) dopo la somministrazione di una singola dose (o esposizione a un determinato dose o concentrazione) di una sostanza di prova, o più dosi date entro 24 ore.

La DL50 è definita come l'espressione derivata statisticamente di una dose singola che si prevede sia letale per il 50% degli animali testati

Table 6.3. Some criteria for the classification of chemicals on the basis of LD50 values from acute oral toxicity data expressed as mg/kg_{bw}

<i>United Nations</i>	toxic 1	toxic 2	toxic 3		
Solids	< 5	< 50	< 500		
Liquids	< 5	< 50	< 2000		
<i>World Health Organization</i>	extremely hazardous	highly hazardous	moderately toxic	slightly toxic	
Solids	< 5	< 50	< 500	< 5000	
Liquids	< 20	< 200	< 2000	< 2000	
<i>European Communities</i>	very toxic	toxic	harmful		
	< 25	< 200	< 2000		
<i>USA</i>	supertoxic	highly toxic	very toxic	moderately toxic	slightly toxic
	< 5	< 50	< 500	< 5000	< 15000

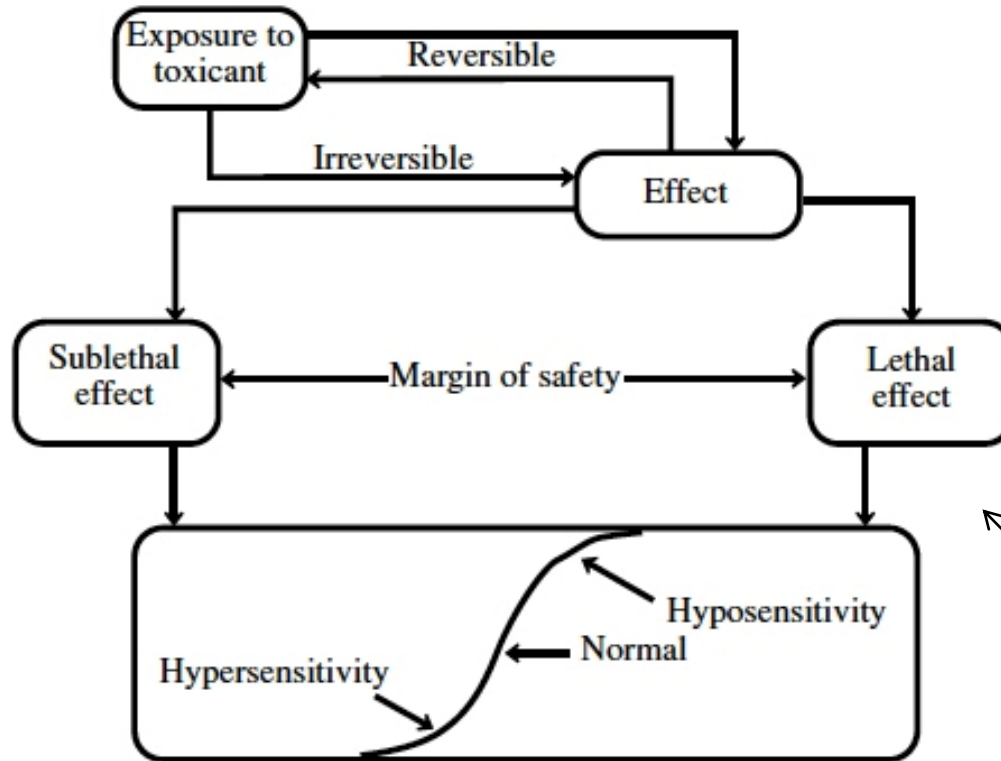
Le DL_{50} hanno un valore limitato nell'esprimere i pericoli per l'uomo.

Questo è perché la morte a seguito dell'esposizione (ambientale) ad una sostanza tossica è un effetto irreversibile relativamente raro.

Maggiormente preoccupanti sono gli effetti subletali che sono spesso reversibili, come le allergie e difetti congeniti, o effetti che possono essere letali ma che non sono acuti come la cancerogenesi.

Tossicologia –Reversibilità e sensibilità

Iper e iposensibilità, risposte “normali”



Effects of and responses to toxic substances.

Effetti irreversibili, permangono dopo l'eliminazione del tossico dall'organismo

MoS è la differenza tra concentrazione di esposizione e conc. letale

*Reazioni allergiche indotte - penicillina
Tolleranza - es Cd²⁺ metallothioneine*

//

Tossicologia non cinetica: effetti dannosi di una specie chimica che si verificano nel sito di esposizione (HNO_3 sulla pelle)

Specie non metabolizzate / trasportate / eliminate dal corpo

Caratteristiche della specie

Sito (area e durata) di esposizione

(Anche nota come

t. non metabolica o t. non farmacologica)

//

Tossicologia cinetica: Specie trasportate / metabolizzate

Veleni sistemici, possono attraversar membrane e agire su recettori

Quando consideriamo la pericolosità di una **sostanza** assumiamo che gli effetti avvengano per **interazione tra essa ed un sito recettore**. Si ha una risposta solo se un quantitativo sufficiente della specie o di un suo metabolita attivo raggiunge il recettore. Ciò evidenzia la rilevanza dell'informazione sui processi di **assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME)**, molto studiati in farmacologia, che determinano il destino all'interno del corpo e le dosi interne al sito bersaglio.

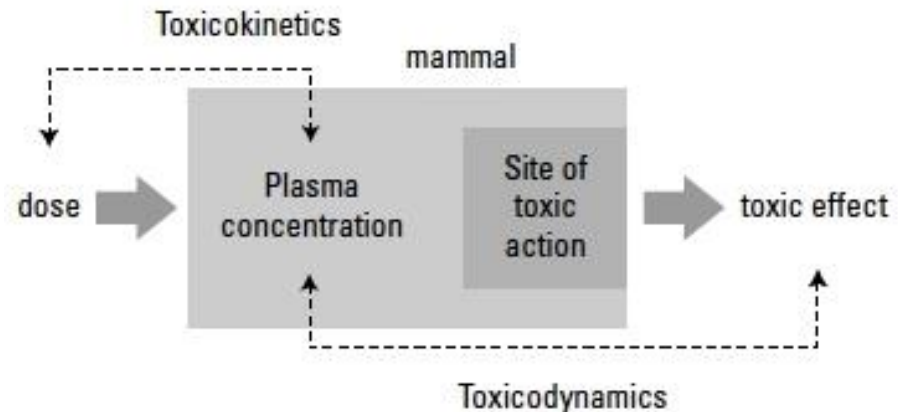


Figure 6.2. Toxicokinetics

Absorption

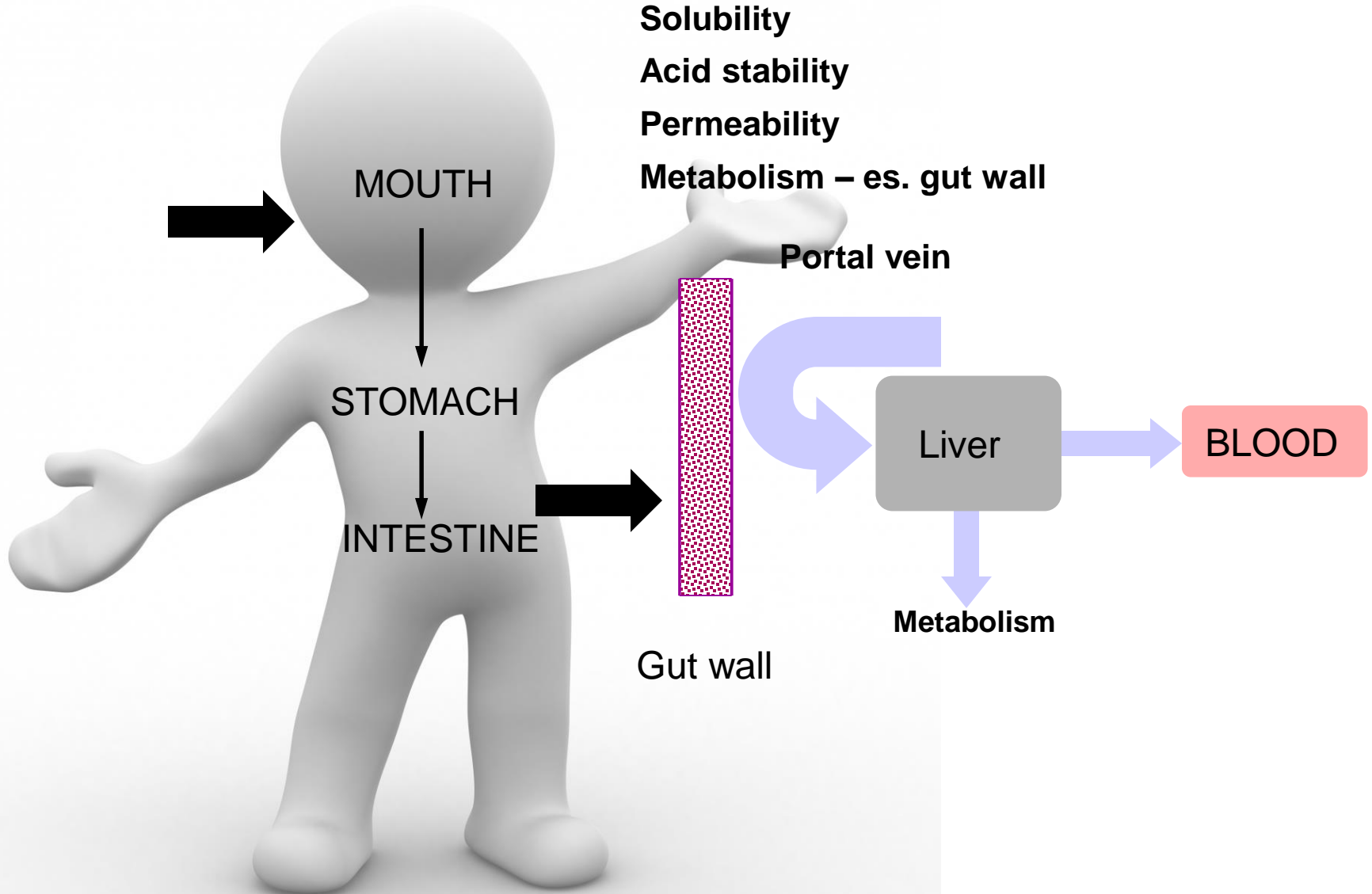
Factors affecting absorption:

Solubility

Acid stability

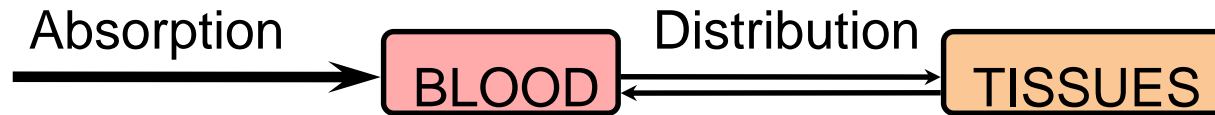
Permeability

Metabolism – es. gut wall



Distribution

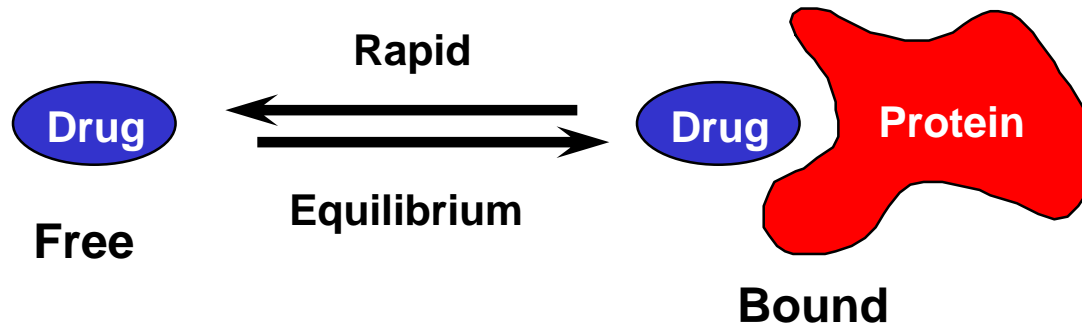
Distribution: the *reversible* transfer of a chemical to and from the systemic circulation



Compounds can distribute out of plasma into tissues:

Main factors influencing distribution are pKa, lipophilicity, plasma protein binding (only unbound chemical is free to distribute in tissues).

Plasma Protein Binding (PPB)



Drugs/chemicals can bind to macromolecules in the blood – known as plasma protein binding (PPB)

Only unbound compound is available for distribution into tissues

Acids bind to basic binding sites on *albumin*, bases bind to *alpha-1 acid glycoprotein*

0-50% bound	= negligible
50-90%	= moderate
90-99%	= high
>99%	= very high

For bases and neutrals, PPB is proportional to $\log D$.

Acidic drugs tend to have higher PPB than neutral/basic drugs.

Metabolism

Definition: Any chemical alteration of a drug/chemical by the living system

Purpose: To enhance water solubility and hence excretability

Types of metabolism

- Phase I: production of a new chemical group on the molecule
- Phase II: addition of an endogenous ligand to the molecule

Sites of metabolism

- Main site of metabolism is the liver.
- Other sites include the gastrointestinal wall (CYP-450), kidneys, blood etc.

Factors affecting metabolism

- The structure of a drug influences its physicochemical properties. (blocking/altering sites of metabolism can improve DMPK properties)
- MW, LogP/LogD, pKa
- The more complex the structure, the more the potential sites for metabolism.

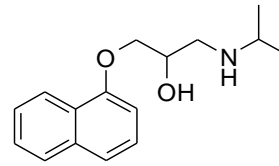
Phase I Metabolism

(i) Oxidation

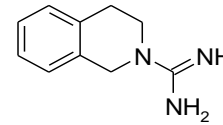
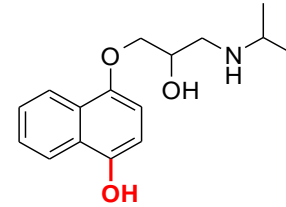
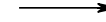
Aliphatic or aromatic hydroxylation

N-, or S-oxidation

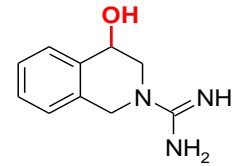
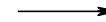
N-, O-, S-dealkylation



Propranolol
(β -blocker)



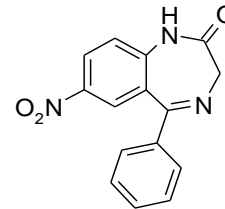
Debrisoquine
(anti-hypertensive)



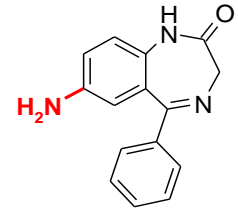
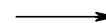
(ii) Reduction

Nitro reduction to hydroxylamine/ amine

Carbonyl reduction to alcohol



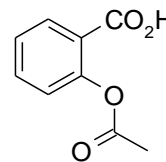
Nitrazepam
(hypnotic)



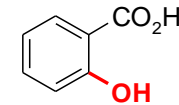
(iii) Hydrolysis

Ester or amide to acid and alcohol or amine

Hydrazides to acid and substituted hydrazine



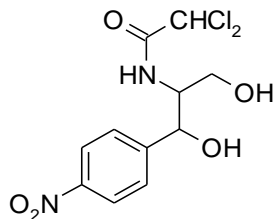
Aspirin
(Analgesic)



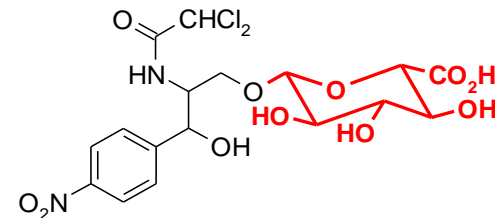
Phase II Metabolism

(i) Glucuronidation

Carboxylic acid, alcohol, phenol, amine



Chloramphenicol
(antibiotic)



(ii) Amino acids

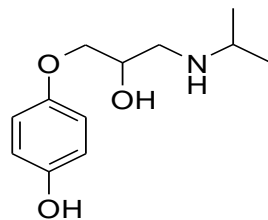
Carboxylic acids

(iii) Acetylation

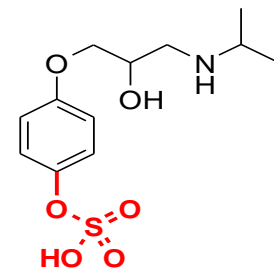
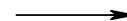
Amines

(iv) Sulfation

Alcohol, phenol, amine



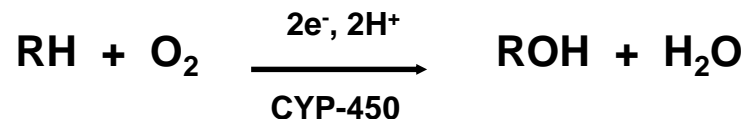
Prenalterol
(β-blocker)



(v) Glutathione conjugation (gly-cys-glu)

Halo-cpds, epoxides, arene oxides, quinone-imine

Cytochrome P450 Enzymes (CYP-450)



Many Phase I oxidations are mediated by cytochrome P450 enzymes.

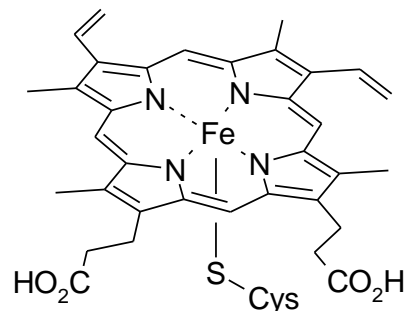
Membrane bound proteins - found on the endoplasmic reticulum.

Heme-containing proteins – porphyrin ring co-ordinating iron at the active site.

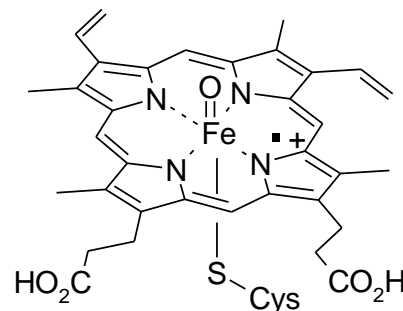
Many iso-forms with different substrate specificities:

Major human CYP's: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4

CYP inhibition/induction:

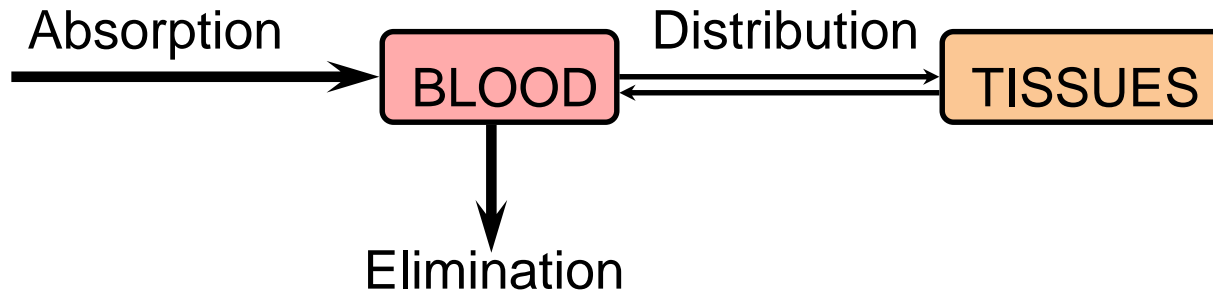


Iron(III) porphyrin



Active oxygen Fe (IV) species

Excretion (Elimination)



Elimination: the *irreversible* transfer of a drug from the systemic circulation

Major routes of elimination:

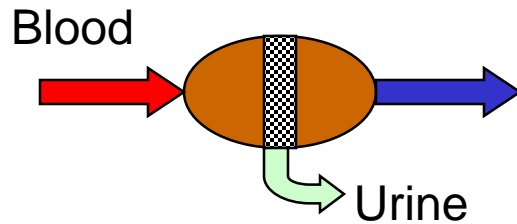
Metabolism

Renal excretion (for free drug, ie low logD)

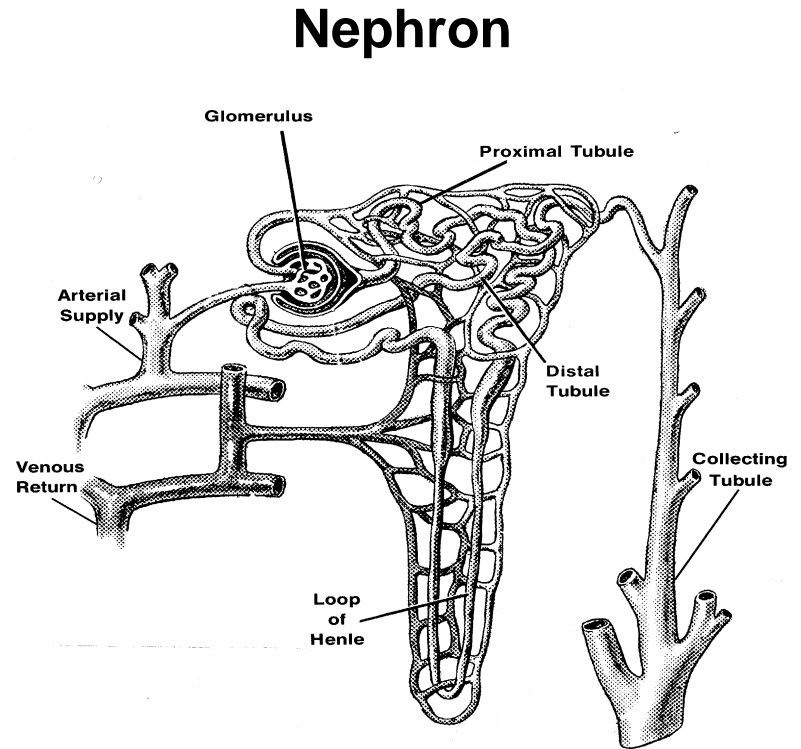
Biliary excretion

Also lungs, sweat etc.

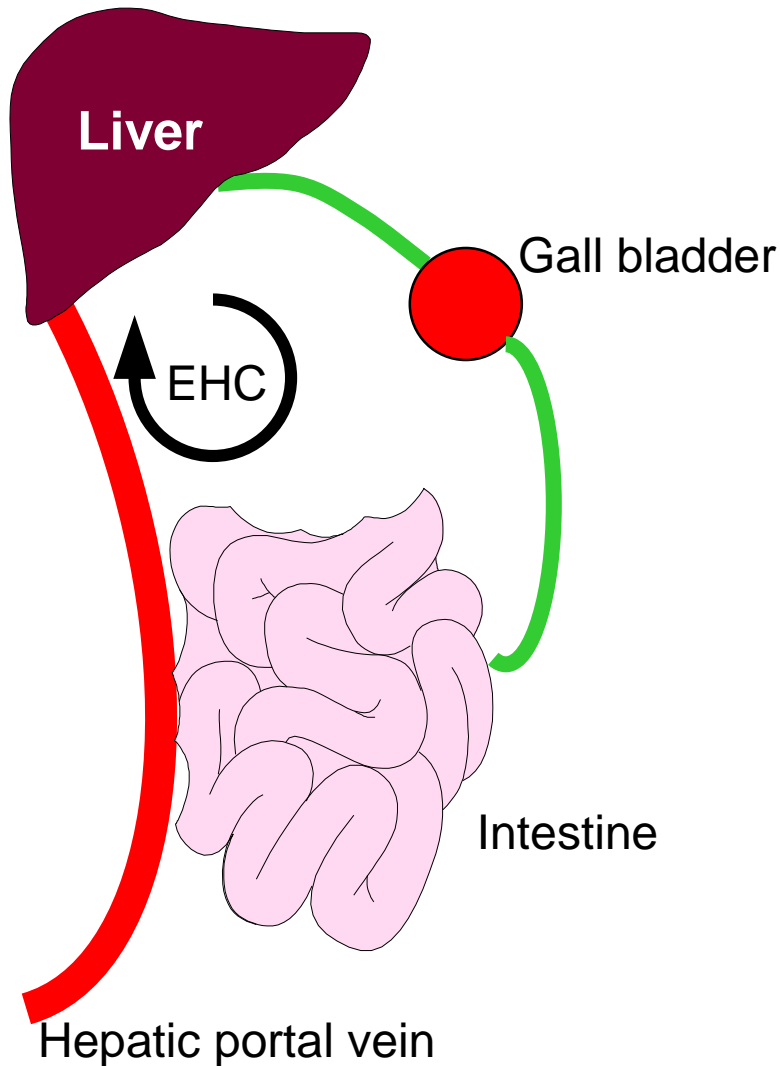
Renal Excretion



1. All **unbound** drug/chemical in plasma is filtered in the glomerulus. Only significant for very polar compounds, $\log D < 0$.
2. Some compounds are actively secreted into urine along the proximal tubule.
3. Unionised drug can undergo passive reabsorption from urine into blood along the length of the nephron (net excretion may be zero).
4. Drug that is bound to plasma proteins is not filtered.



Biliary Excretion

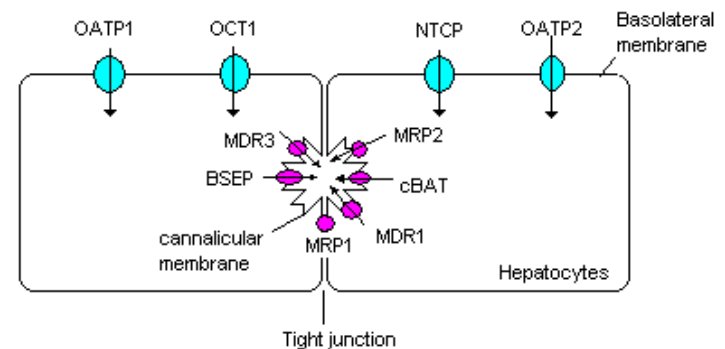


In the liver drugs/chemicals can be secreted into the bile

Transporters in the basolateral and canalicular membranes of hepatocytes mediate uptake into the hepatocyte and efflux into bile

Biliary clearance is commonly higher in Rats/Mice than in Dog/Man

Bile collects in gall bladder, then released into intestine upon food intake. Drug/chemical may then be reabsorbed - known as enterohepatic recirculation (EHC).



Tossicologia cinetica: Specie trasportate / metabolizzate

Veleni sistemici, possono attraversar membrane e agire su recettori

Quando consideriamo la pericolosità di una **sostanza** assumiamo che gli effetti avvengano per **interazione tra essa ed un sito recettore**. Si ha una *risposta solo se un quantitativo sufficiente della specie o di un suo metabolita attivo raggiunge il recettore*. Ciò evidenzia la rilevanza dell'informazione sui processi di **assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME)**, molto studiati in farmacologia, che determinano il destino all'interno del corpo e le dosi interne al sito bersaglio.

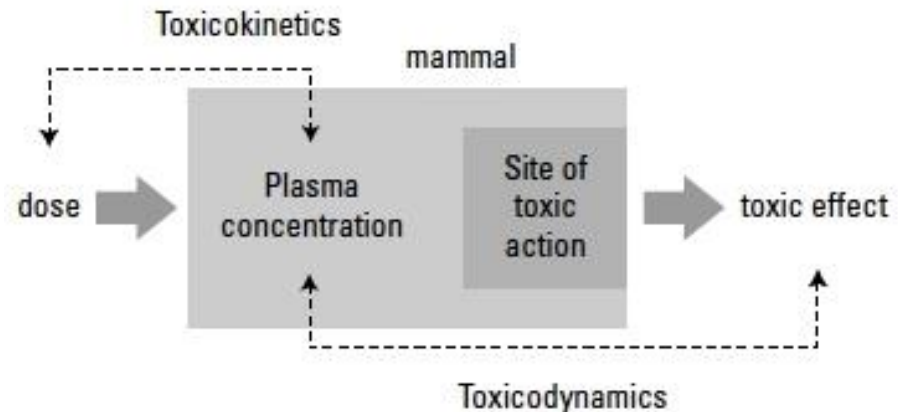


Figure 6.2. Toxicokinetics

Biocinetica - decorso temporale di una sostanza chimica in un organismo vivente, vale a dire, aumento o la diminuzione di sostanza presso il sito di misura dovuti a trasporto o trasformazione o degradazione. Il termine "tossicocinetica" è spesso usato come sinonimo

RAoC Iled p.229

Deve rispondere a domande in termini di

Cosa e quanto?

Dove?

Quando (velocità/tasso)?

Es un composto ha un'emivita di 6h nel plasma (dove?)

Toxicokinetic Modeling of Persistent Organic Pollutant Levels in Blood from Birth to 45 Months of Age in Longitudinal Birth Cohort Studies

<http://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/121/1/ehp.1205552.pdf>

Le curve della concentrazione contro il tempo di una sostanza nel plasma o nel sangue sono risultati importanti per gli studi cinetici: sono surrogati per descrivere le concentrazioni al tessuto bersaglio. Si calcola la dose interna/ **esposizione interna come **AUC - area sotto la curva** (concentrazione nel plasma vs tempo). Le AUC sono usate per varie estrapolazioni (es interspecie)**

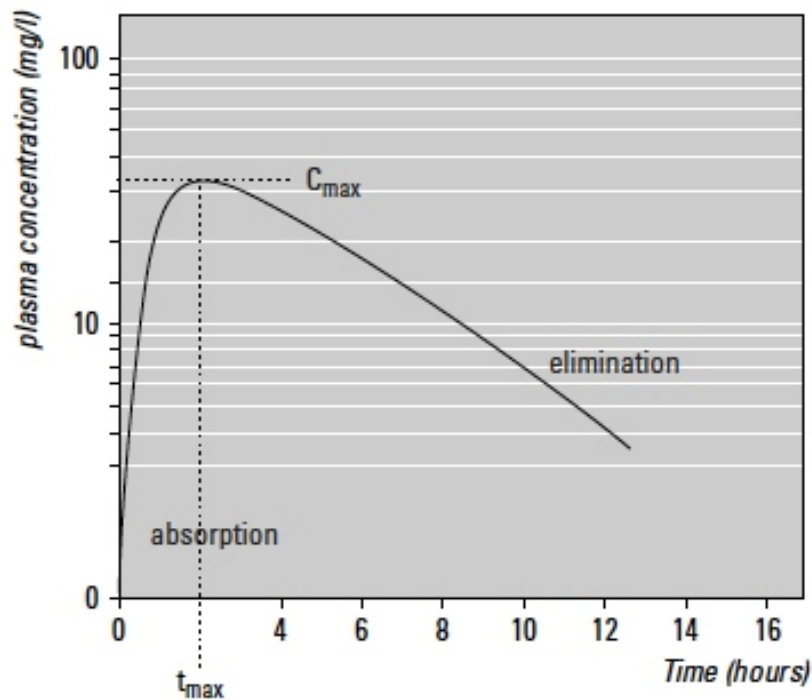


Figure 6.3. Absorption and elimination (<http://coo.lumc.nl/TRC/>).

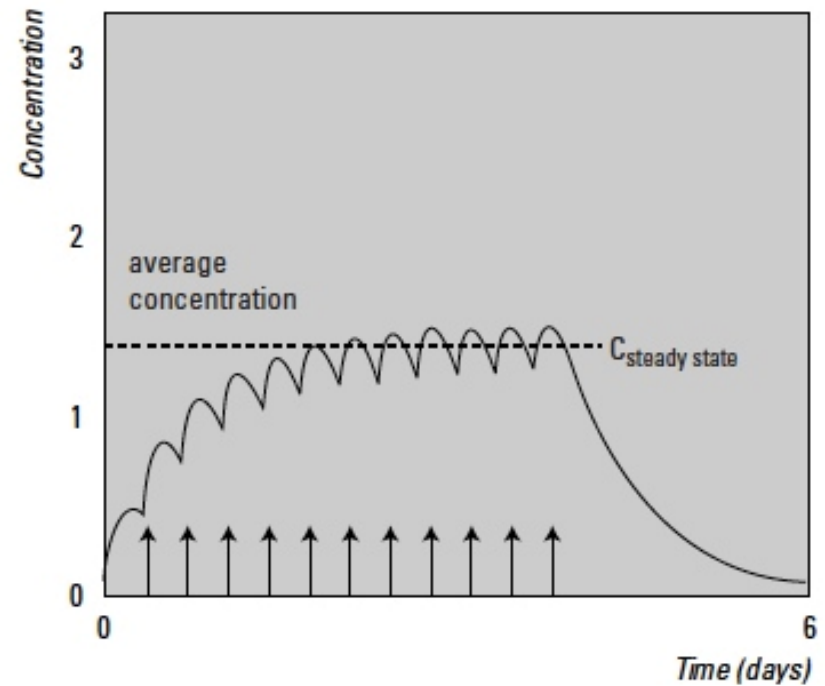
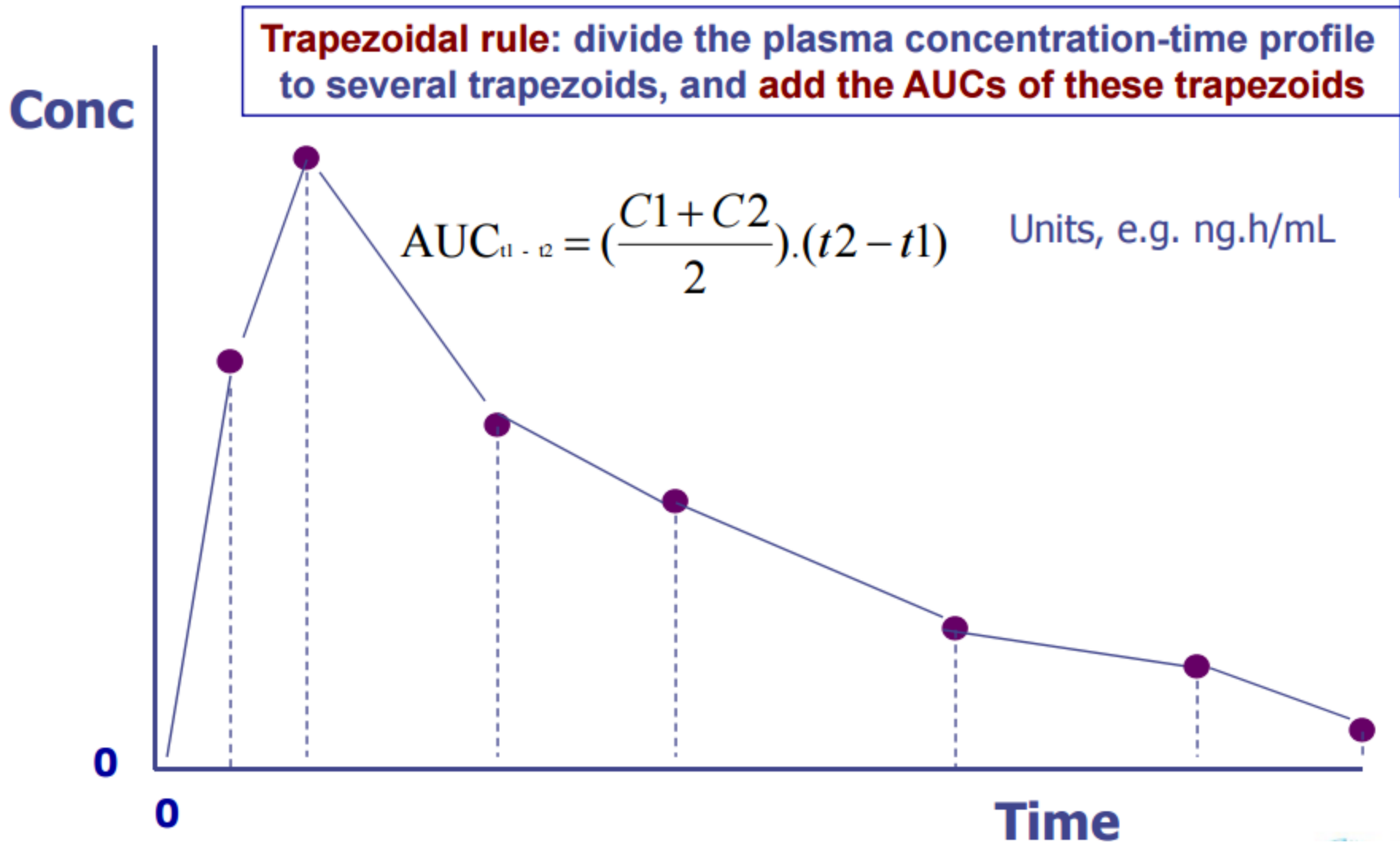


Figure 6.4. Steady-state (<http://coo.lumc.nl/TRC/>).



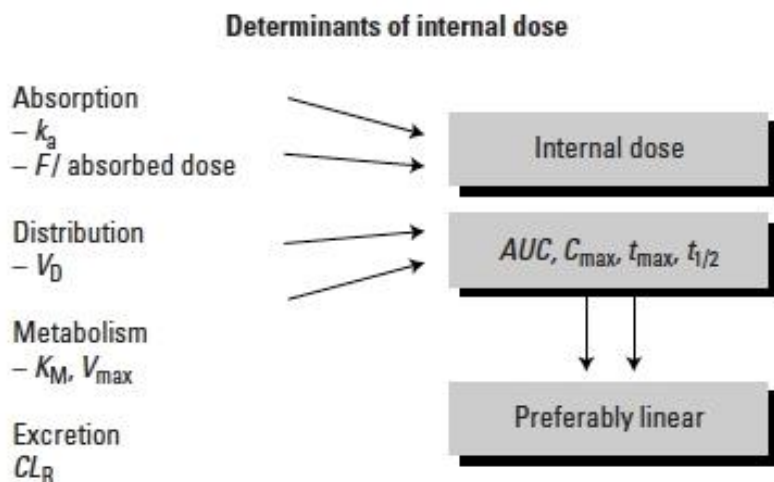
Parametri rilevanti per definire le dosi interne

Table 6.2. Primary parameters of ADME.

Process	Primary parameter
Absorption	absorption rate constant (k_a) and <u>bioavailability (F)</u> ¹
Distribution	apparent volume of distribution ($V_D = A / C$) ² as an indicator of the tissues involved
Metabolism	intrinsic clearance, described by V_{max} and K_M
Excretion	sum of biliary excretory and renal clearance (CL), irreversible loss of compound from the body

¹ F = Fraction of dose reaching the systemic circulation. It should be noted that bioavailability has a different meaning in environmental toxicity issues, where the bioavailable fraction is the fraction of the total amount of a chemical present in a specific environmental compartment that, within a given time span, is either available or can be made available for uptake by organisms, micro-organisms or plants. Substances that are irreversibly bound to, e.g. soil or sediment, are not bioavailable.

² A = amount in body at equilibrium, C = concentration in blood.



Intrinsic Clearance (CL_{int}),
 Maximum Velocity of the Metabolic Reaction (V_{max}),
 Michaelis Constant (K_M)

Figure 6.5. Determinants of internal dose (for symbols see Table 6.2).

Ripartizione a partire dal sangue (**blood partitioning**) è definita in base al tessuto target; le costanti di partizione dipendono da proprietà chimico fisiche della sostanza e proprietà chimico fisiche del tessuto (es. contenuto lipidico e proteico)

Velocità e entità/estensione della partizione:

Velocità: **velocità di perfusione** (la velocità del flusso di sangue attraverso i capillari per unità di massa di tessuto, espressa in millilitri al minuto per 100 g)

Estensione: Il **volume di distribuzione** (V_d) indica la capacità di diffusione e penetrazione di farmaci o tossici nei vari organi e tessuti. Si definisce come il volume teorico che sarebbe necessario a contenere la quantità totale di farmaco/chemical presente nell'organismo alla stessa concentrazione di quella presente nel plasma. Si calcola come rapporto tra la dose di farmaco presente nell'organismo (che nel caso di un assorbimento del 100% corrisponde alla dose somministrata) e la concentrazione plasmatica del farmaco stesso.

Nell'organismo vengono distinti tre compartimenti di fluidi:

plasma (circa 3 litri) / fluidi interstiziali / fluidi intracellulari.

Il plasma e i fluidi interstiziali formano insieme i fluidi extracellulari, pari a circa 12-13 litri.

La somma di questi tre volumi costituisce l'acqua totale corporea o TBW (Total Body Water), che consiste per definizione nel volume di distribuzione dell'acqua triziata, e che è pari cioè a circa 42-43 litri in un soggetto di peso normale (circa 70 kg).

A seconda della sua idro- o liposolubilità, una sostanza può avere volumi di distribuzione molto diversi.

Sostanza	Vd	Compartimento corporeo	Comportamento
Molto polare (es. Blue Evans)	3,3 litri	Plasma	Non passa le membrane delle cellule endoteliali e non esce dal plasma
Idrosolubile (es. mannitolo)	12 litri	Acqua extracellulare	Passa nell'interstizio ma non entra nelle cellule
Liposolubile (es. cloramfenicolo)	42 litri	Acqua totale	Passa senza problemi tutte le membrane cellulari
Molto liposolubile (es. metoprololo)	330 litri	Vd apparente	Lega le proteine plasmatiche e si deposita nel tessuto adiposo

Biodisponibilità F: paragone tra AUC per la via di esposizione d'interesse (es. orale) e per la somministrazione intravenosa (riferimento)

$$F = D_{i.v.} / D_x * AUC_x / AUC_{i.v.}$$

X è la via di esposizione considerata

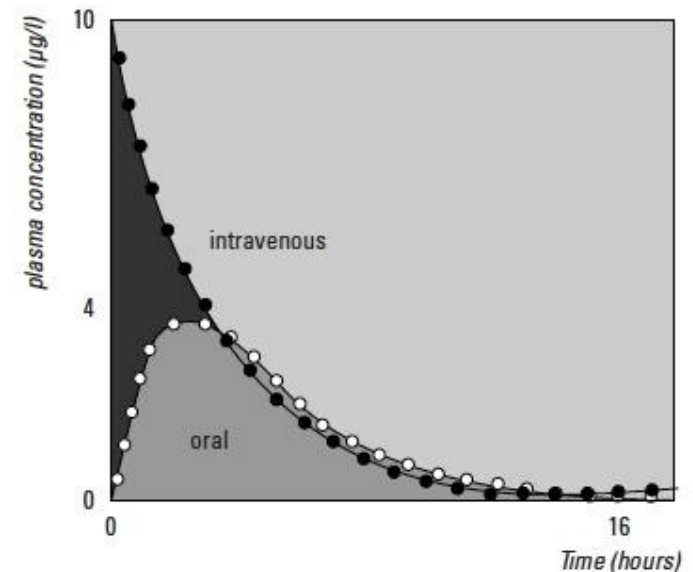
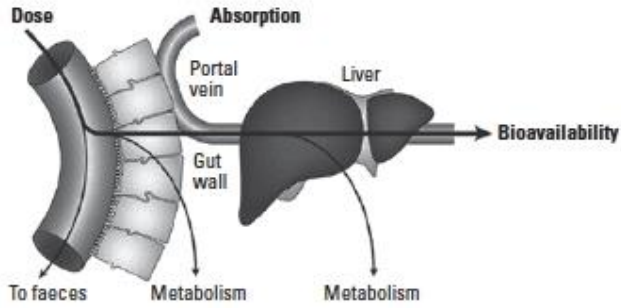


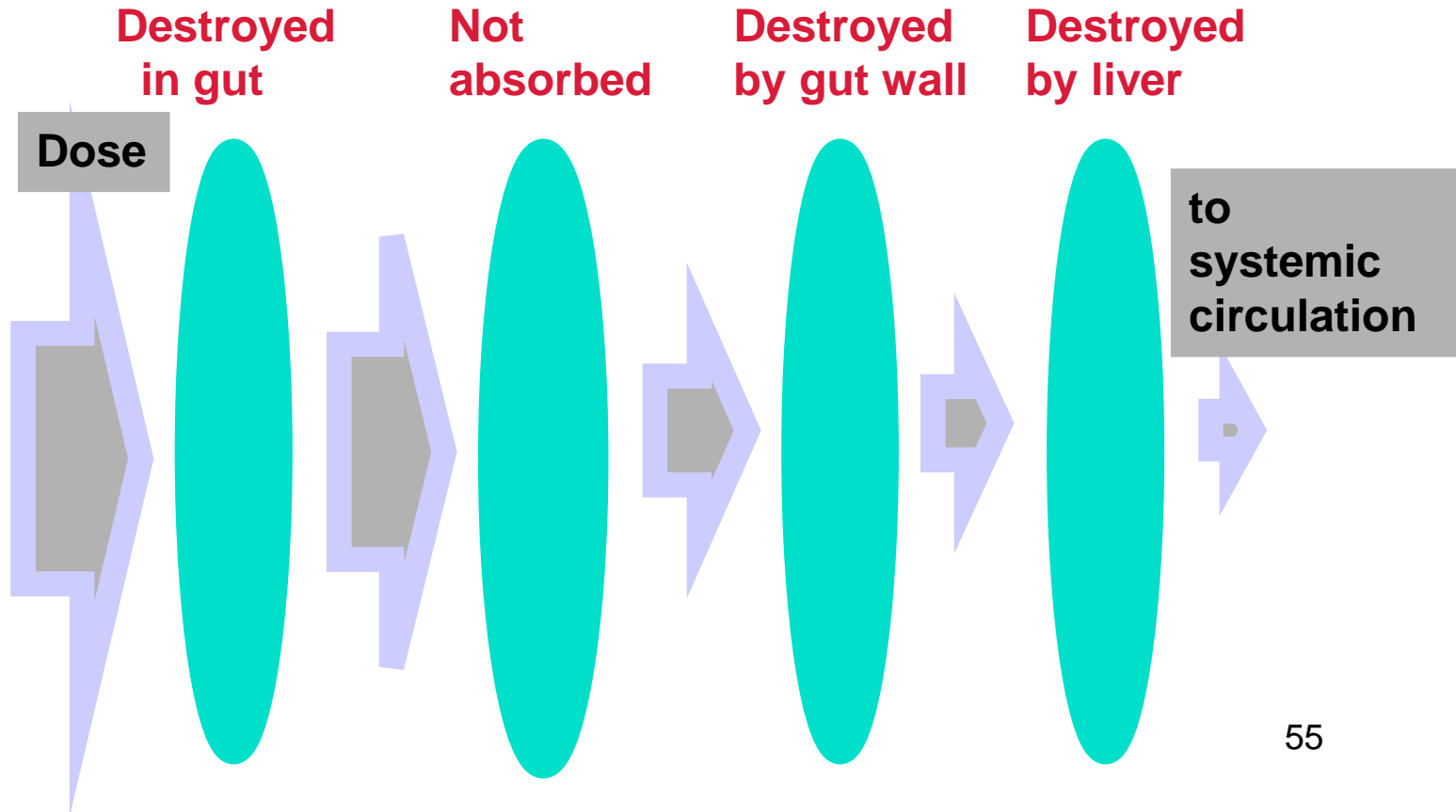
Figure 6.7. AUC oral (○○○) versus AUC intravenus (●●●).
Source: <http://coo.lumc.nl/TRC/>.

Assorbimento = passaggio di membrana (epitelio polmonare, epidermide, tratto gastrointestinale), **che può essere seguito da biotrasformazione** (può diminuire la biodisponibilità!!!)

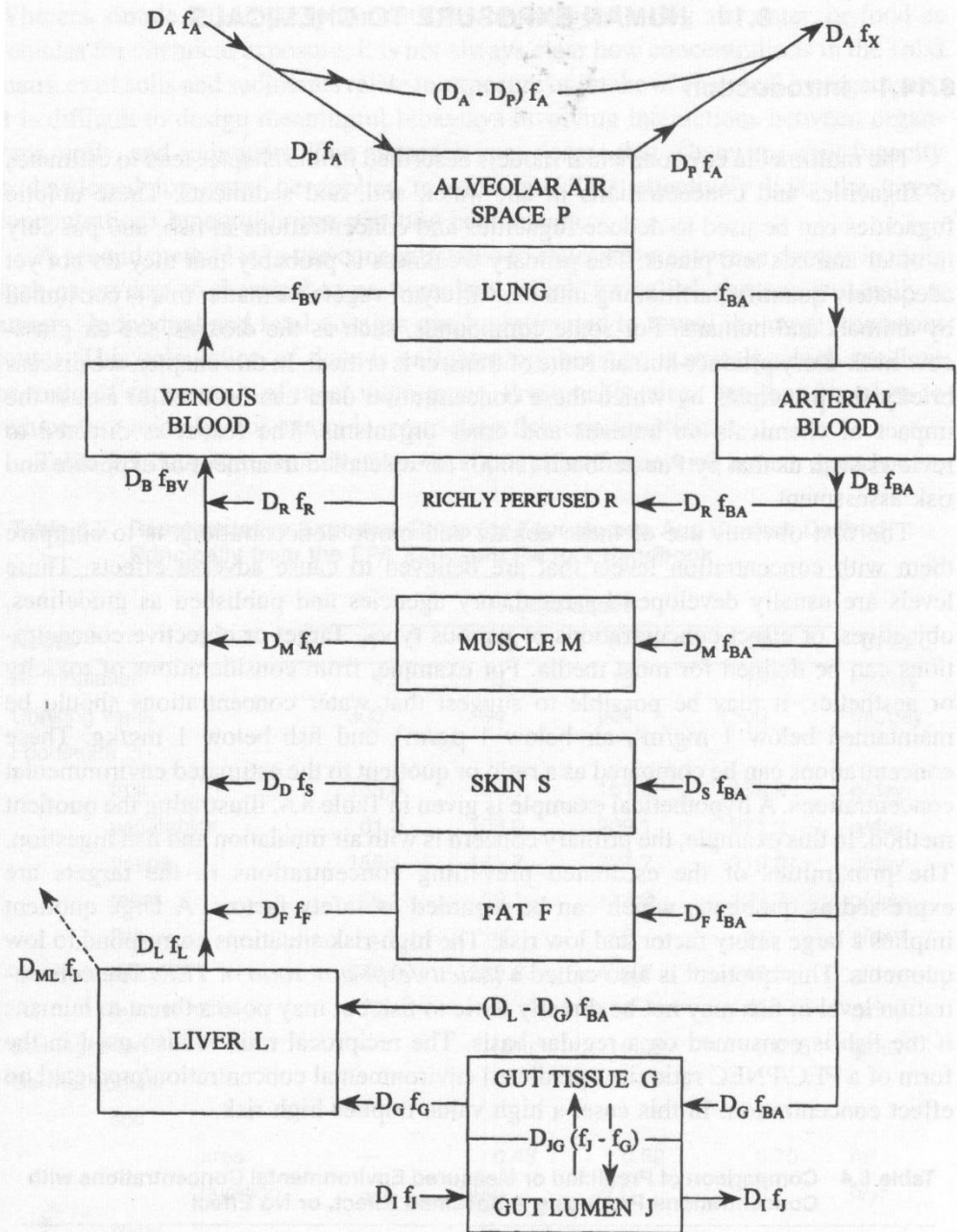


Bioavailability

Figure 6.6. Bioavailability [22]. With permission.



Modelli PBPK



http://users.ugent.be/~lvbortel/Friday_1.pdf

Figure 8.12 Transport and transformation in a multicompartment pharmacokinetic model as applied to humans.

Attenzione alle estrapolazioni da una via d'esposizione ad un'altra...

Es. da ingestione a inalazione o contatto dermico in igiene occupazionale.

Se “costretti” si aumentano i margini di sicurezza.

- Distribuzione ed accumulo

Interspecies extrapolation – Differences in the lipid and protein content of tissues may result in species dependent distribution. Further, species specific excretion capacity may result in increased V_D and increased tissue concentrations (e.g., saturation of renal excretion in dog for phenoxyacetic acid compound).

Intraspecies extrapolation – Females often have increased fat content compared to males, possibly resulting in a different V_D .

- Metabolismo ed estrapolazioni tra vie di esposizione

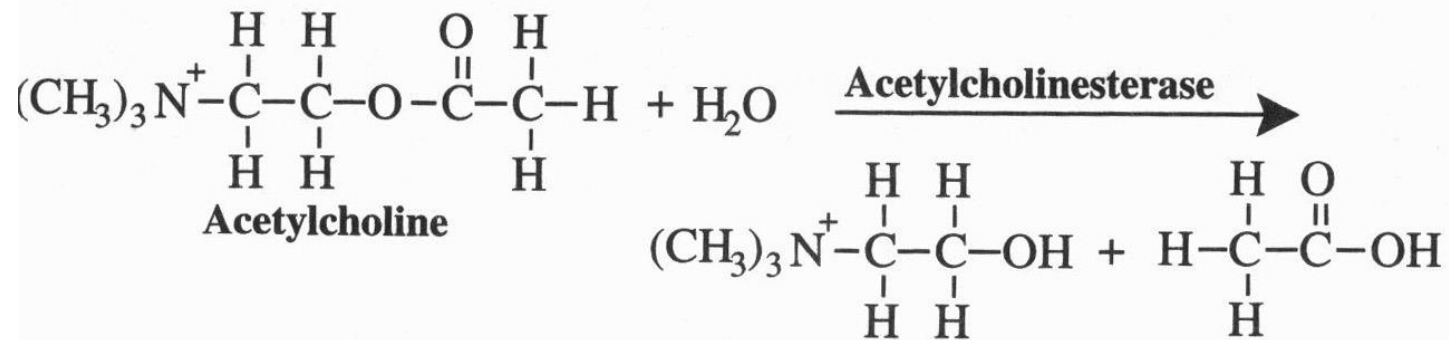
Interspecies extrapolation – Activating or deactivating metabolism may be very species-specific.

Intraspecies extrapolation – Biotransformation in neonates and very young animals and children is qualitatively and quantitatively different from adults and young adults; variation due to age, pregnancy, lifestyle.

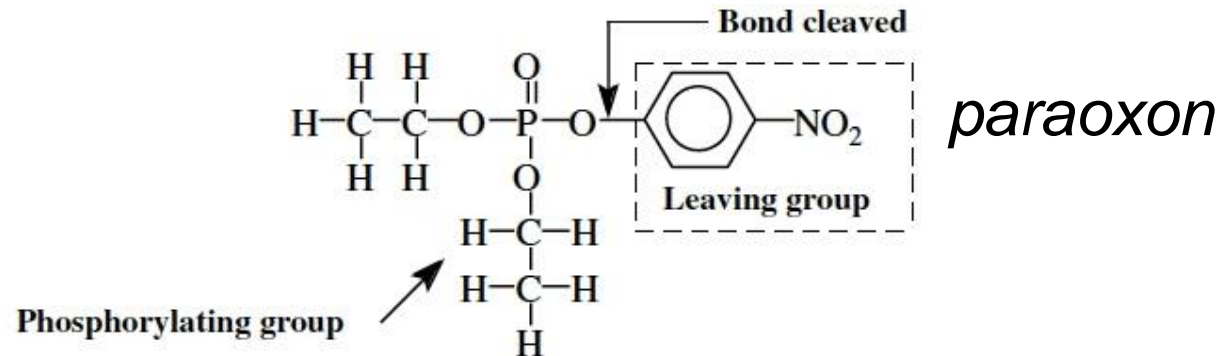
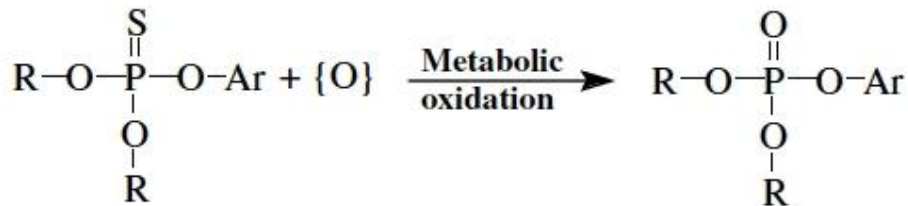
Route-to-route extrapolation (different first-pass effects) – Activation or deactivation by first-pass metabolism may be route-specific, thereby making route-specific metabolism the Achilles' heel of route-to-route extrapolation.

RECETTORI e sostanze tossiche

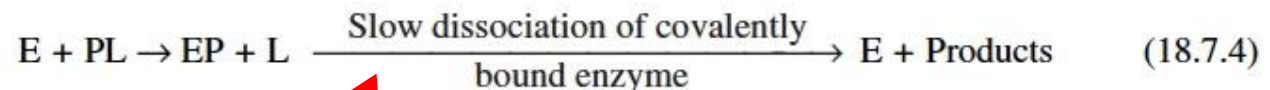
Es. Funzionamento normale: l'acetilcolina è un neurotrasmettitore che deve essere idrolizzato enzimaticamente per evitare eccessiva stimolazione da parte ai recettori nervosi



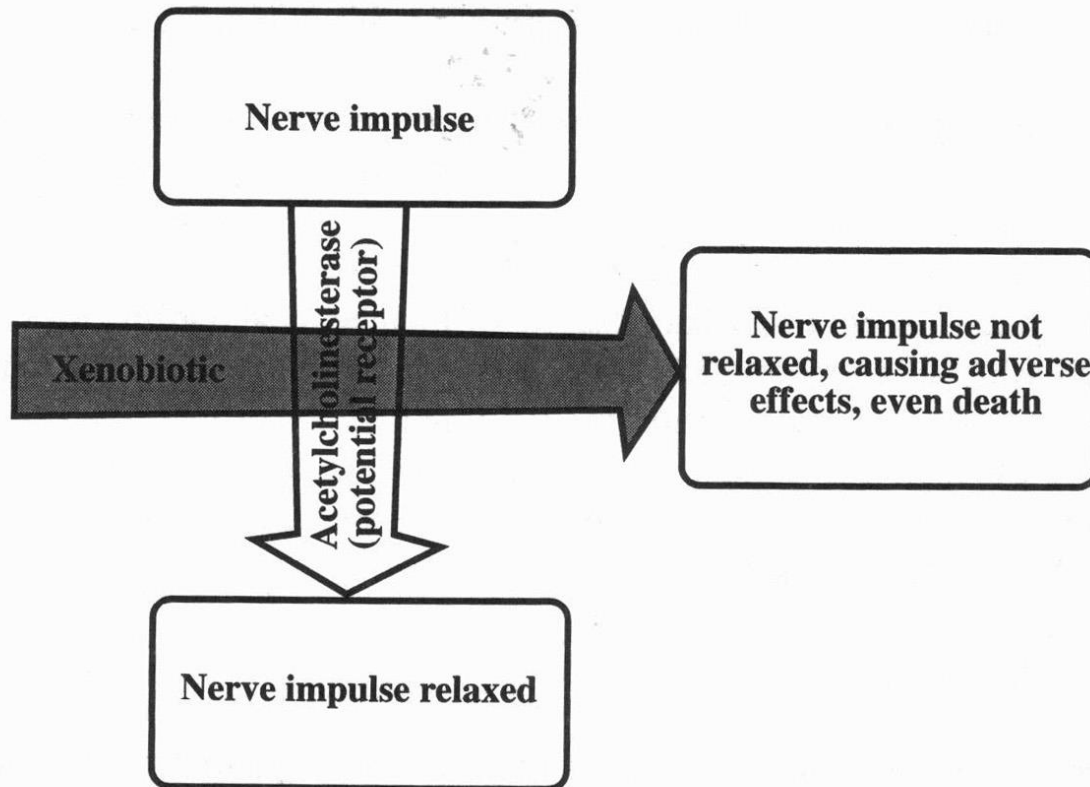
Parathion \rightarrow *Paraoxon attivazione*



The reaction of this compound with cholinesterase enzyme (E) can be represented by the following reaction:



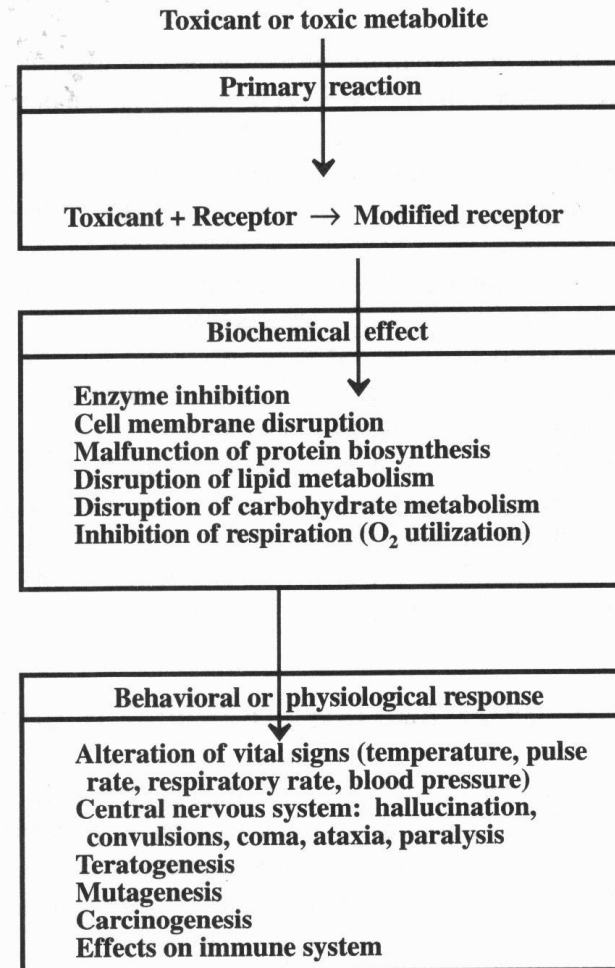
Tossicologia – recettori e sostanze tossiche



Example of a toxicant acting on a receptor to cause an adverse effect. When acetylcholinesterase is bound by a xenobiotic substance, the enzyme does not act to stop nerve impulse. This can result in paralysis of the respiratory system and death.

Tossicologia – fasi di tossicità

Dopo la *fase cinetica*, che trasporta la specie tossica al recettore, inizia la *fase dinamica*



Different major steps in the overall process leading to a toxic response.

Tossicologia – tossificazione e detossificazione

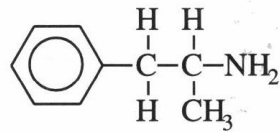
Composto genitore attivo

Metabolita attivo.

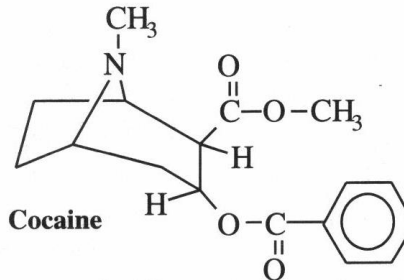
Effetti additivi / sinergici / di potenziamento /

Effetti antagonisti / “blockers” (competizione per un sito)

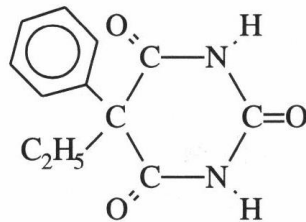
Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



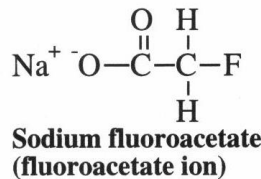
**Amphetamine
(benzedrine)**



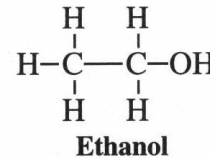
Cocaine



**Phenobarbital
(a barbiturate)**

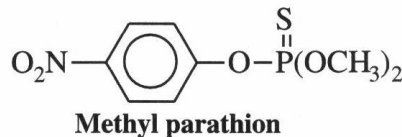


**Sodium fluoroacetate
(fluoroacetate ion)**

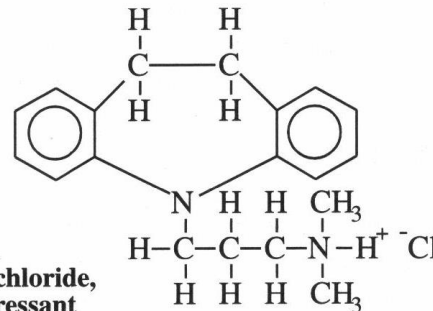


Ethanol

Examples of toxicants that affect body temperature. Amphetamine, cocaine, and fluoroacetate increase body temperature; phenobarbital and ethanol decrease it.



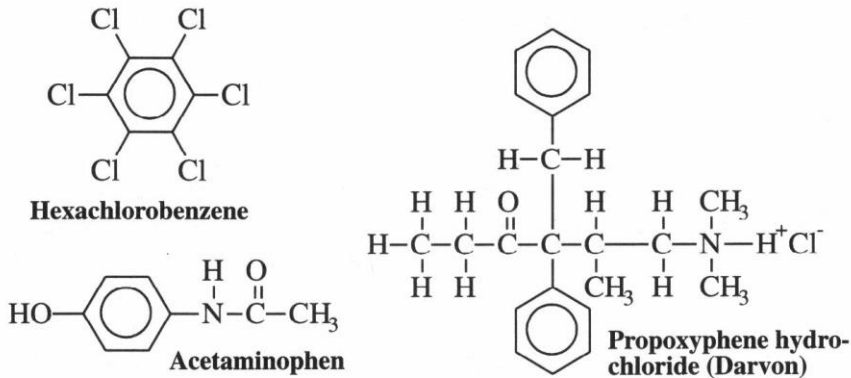
Methyl parathion



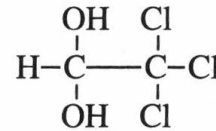
**Imiprimine hydrochloride,
a tricyclic antidepressant**

Structures of toxicants that can affect pulse rate. Methyl parathion, a commonly used plant insecticide, can cause bradycardia. Imiprimine hydrochloride, a tricyclic antidepressant, can cause either tachycardia or arrhythmia.

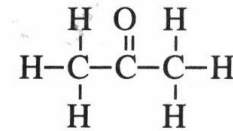
Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



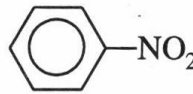
Some compounds that affect respiratory rate. Acetaminophen is one of the simple analgesics, which in therapeutic doses relieves pain without any effect on an individual's consciousness. Propoxyphene hydrochloride is a narcotic analgesic, a class of substances that can cause biochemical changes in the body leading to chemical dependency.



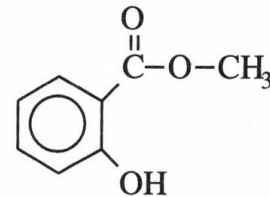
Chloral hydrate
(pear odor)



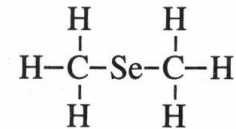
Acetone
(acetone odor)



Nitrobenzene
(shoe polish)



Methyl salicylate
(wintergreen)



Dimethyl selenide
(garlic)

Tossicologia – effetti riproduttivi e sullo sviluppo

Effetti tossici sullo sviluppo

Effetti teratogeni (talidomide) (primo trimestre di gravidanza)

Effetti sul sistema riproduttivo

Effetti mutageni (alterazione del DNA)

Studi sulla tossicità

Molti aspetti critici ci si riferisce spesso alla “**bibbia**” **gialla del WHO/OMS** “*Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals: Part I*”;

Indicazioni sono reperibili anche su “*Guidelines for testing chemicals*” dell’OECD/OCSE

Bada a:

- Proprietà chimiche

- vie d’esposizione

- Selezione e cura degli animali (dieta e condizioni di stabulazione)

- Acquisizione dei dati e presentazione e interpretazione dei risultati

- Good laboratory practices (US-FDA, USEPA, OECD, EC)*

Incertezze nei test su animali *UN International Program on Chemical Safety (1978)*

Aspetti generali

Test substance

Dose selection

Animal species

Test duration

Diet

Other environmental variables

Parameters studied

Electronic data processing

Presentation of results

Interpretation and evaluation of results

GLP

Requisiti del personale

Benessere degli animali

Dati umani

Incertezza e variabilità

International Program on Chemical Safety. 1978.
Principles and methods for evaluating the toxicity
of chemicals. Part I. World Health Organization,
Environmental Health Criteria 6.

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc006.htm>

Test di tossicità acuta:

singola dose o dosi ripetute nelle 24 ore

Esiti rilevati entro 14 giorni dall'esposizione

Richiesto nel REACH (esposizione orale se non sono disponibili dati di e. inalatoria) per sostanze con produzione importazione maggiore di 1 tonnellata/anno; per più di 10 t/y serve test su ulteriore via d'esposizione.

Si verifica in genere letalità

Test acuti locali

Irritazione e corrosione *richiesti nel REACH per sostanze con t/y >10*

"Irritant substances are non-corrosive substances which cause inflammation as evidenced by erythema and oedema of the skin and corneal opacity, iridal effects and conjunctival redness or swelling for the eye. Corrosive substances may destroy living tissues."

In vivo su conigli / no dose-risposta, no LOEL

Sensibilizzazione *richiesto nel REACH per sostanze con t/y >1*

Skin sensitization (-> allergic contact dermatitis) is a common form of allergy. Following skin exposure, it develops in 2 phases: induction (sensitization) and elicitation. 1) a primary immune response is triggered following a reaction between the chemical allergen and skin protein. 2) if the sensitized individual comes in contact with the same chemical allergen again in a later stage, a more pronounced secondary response is induced

Test di tossicità acuta

Table 5.2. Acute toxicity tests

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, dermal, inhalatory
Experimental animals	rat, (mouse), rabbit, guinea pig, (dog)
Number of animals	5 of each sex per group
Dose levels	control and at least 3 or more if necessary for calculating LD50 or LC50 ^a
Examinations	<ul style="list-style-type: none">- clinical examination for signs of toxicity or death- gross examination- histopathological examination if indicated
Results	the LD50 or LC50 value for each sex at 95% confidence interval

^a If a dose of 2000 mg/kg_{bw} does not cause acute toxicity and compound-related mortality, a full study may not be necessary.

Table 5.4. Evaluation and interpretation of results of acute toxicity tests (fixed dose procedure)

Dose	Results	Interpretation
5 mg/kg _{bw}	less than 100% survival	compounds which are <i>very toxic</i>
	100% survival; but evident toxicity	compounds which are <i>toxic</i>
	100% survival; no evident toxicity	see results at 50 mg/kg
50 mg/kg _{bw}	less than 100% survival	compounds which may be <i>toxic</i> or <i>very toxic</i> ; see results at 5 mg/kg
	100% survival; but evident toxicity	compounds which are <i>harmful</i>
	100% survival; no evident toxicity	see results at 500 mg/kg
500 mg/kg _{bw}	less than 100% survival	compounds which may be <i>toxic</i> or <i>harmful</i> ; see results at 50 mg/kg
	100% survival; but evident toxicity	compounds considered as having no significant acute toxicity
	100% survival; no evident toxicity	see results at 2000 mg/kg
2000 mg/kg _{bw}	less than 100% survival	see results at 500 mg/kg
	100% survival; with or without evident toxicity	compounds which do not have significant acute toxicity

Tossicità per dosi ripetute

Più che a dosi elevate a seguito di incidenti gli esseri umani possono essere esposti ripetutamente a basse dosi di contaminanti ambientali

Esempi di test con somministrazioni ripetute ad animali da esperimento sono la prova sub-acuta di 28 giorni, il test subcronico di 90 giorni e il test cronico per la durata di vita. Il requisito minimo di solito è la prova di 14 o 28 giorni con ratti.

In base al REACH, è richiesto uno studio di tossicità a dose ripetuta (almeno una prova di 28 giorni) per un livello annuale di produzione o di importazione di 10 tonnellate

Si ottengono informazioni su quelli che sono gli organi bersaglio, relazioni dose/risposta, NOAEL o BDC
Ratti e cani, usualmente giovani (più sensibili)

Table 5.5. Repeated dose studies (28 and 90 d)

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, dermal, inhalatory
Experimental animals	rat (mouse, dog)
Number of animals	5 to 10 of each sex per group ^a
Dose levels	control and at least 3 dose levels with an increment of 2 to 10 (sometimes satellite groups)
Examinations	<ul style="list-style-type: none"> - body weight, food consumption and water consumption - clinical examination. haematological parameters: haematocrit, haemoglobin concentration, erythrocyte counts, total and differential leukocyte count, clotting potential; biochemical parameters: including organ function, parameters, electrolyte balance, carbohydrate metabolism, serum salts (Ca, P, Na, K, Cl), glucose, serum enzymes, urea nitrogen, albumen, serum protein, creatinin, bilirubin (lipids, hormones, methaemoglobin, choline-esterase activity), urine analysis - gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy - organ weights - histopathological examination: of all preserved organs and tissues (30 or more) of highest dose and control. If indicated, intermediate and low dose groups
Results	information concerning effects of repeated dose exposure for parameters measured, target organ(s); if possible, mechanism of action and NOAEL

^a For a range finding test 5 animals per sex per group may be sufficient for experiments with dogs, usually groups of 4 to 5 animals per sex are used.

Table 5.6. Chronic toxicity studies (6 to 24 months)

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, inhalatory
Experimental animals	rat (mouse, dog)
Number of animals	20 (dogs 4 to 5) per sex per group
Dose levels	control and at least 3 dose levels with an increment of 2 to 10 (sometimes satellite groups)
Examinations	<ul style="list-style-type: none"> - body weight, food consumption and water consumption during the first 13 weeks at weekly intervals and later at 4 week intervals (body weight) or 3 month intervals (food and water consumption) - clinical examination: haematological and biochemical examination and urine analysis (Table 5.5) at onset of study and at 6 month intervals - gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy - organ weights - histopathological examination in full of all preserved organs and tissues of highest dose and controls. If indicated, of intermediate and lowest dose
Results	information concerning effects of repeated dose exposure on parameters studied, target organ(s); if possible, mechanism of toxicity and NOAEL

Genotossicità

Genotoxicity refers to potentially harmful effects on genetic material. It **includes mutagenicity** which can be defined as the induction of permanent transmissible changes in the amount or structure of the genetic material.

Genotoxicity tests also provide indications of **other DNA damage** through unscheduled DNA synthesis, sister chromatid exchange (*scambio di porzioni omologhe di DNA tra i due cromatidi costituenti un cromosoma*), strandbreaks, adduct formation, mitotic recombination and Numerical chromosome aberrations (*aneuploidy - variazione nel numero dei cromosomi, rispetto a quello che normalmente caratterizza le cellule di un individuo*).

Genotoxicity testing is very useful in **pre-screening for potential genotoxic carcinogenicity**

Regolamento REACH: Il requisito di base è un test di Ames su batteri per le mutazioni per un quantitativo di sostanza annuale di 10 tonnellate.

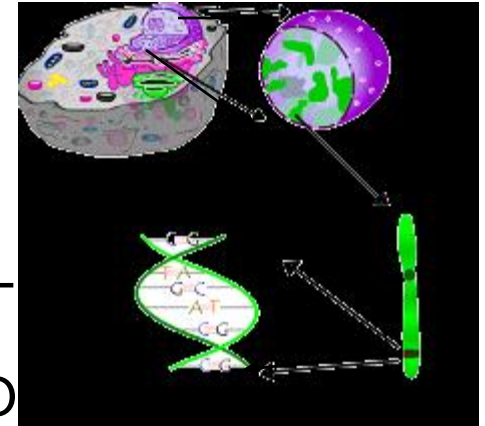
Il test di Ames, ideato da Bruce Ames nel 1973, è un test genetico per l'analisi della genotossicità di una sostanza.

Si basa sulla *valutazione della capacità di un sospetto mutageno di provocare la reversione di un carattere auxotrofo his- in un ceppo di batteri mutato (Salmonella typhimurium), rendendolo nuovamente capace di sopravvivere in un terreno privo di istidina.*

Essendo condotto in cellule batteriche, il test di Ames non consente di valutare la capacità dei mutageni di alterare la struttura cromosomica del DNA umano.

Va eseguito insieme a test su cellule eucariotiche (test dei micronuclei, test della cometa, quantificazione degli addotti al DNA) e su animali in vivo. Vi è comunque una buona correlazione fra l'effetto mutageno riscontrato nel test di Ames e la cancerogenità della sostanza

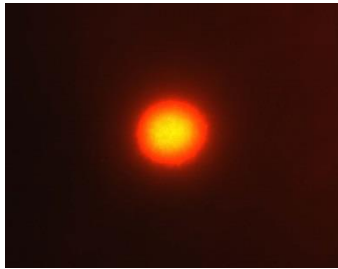
Test della Cometa (SCGE)



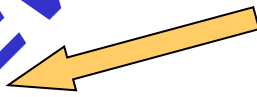
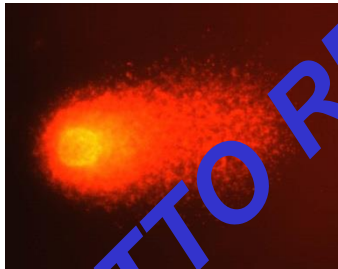
PRINCIPIO



LE ROTTURE DEL
FILAMENTO DEL
DNA SI POSSONO
EVIDENZIARE
TRAMITE
L'ELETTROFORESI



OSSERVAZIONE AL
MICROSCOPIO A
FLUORESCENZA



EFFETTO REVERSIBILE

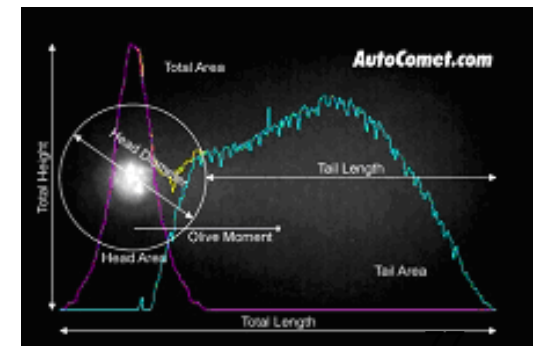


Table 5.7. Carcinogenicity studies

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, inhalatory
Experimental animals	rat, mouse, (dog), (monkey)
Number of animals	50 per sex per group (sometimes satellite groups); dogs and monkeys usually not more than 7 to 10 per group
Dose levels	control and at least 3 dose groups, for proper quantitative risk assessment more dose groups
Examinations	<ul style="list-style-type: none"> - body weight, food consumption and water consumption at various intervals (see Table 5.6) - clinical examination at intervals (see Table 5.6) of 10 to 20 animals per sex per group - gross examination: daily observation and extensive gross examination on termination - histopathological examination in full of highest dose and controls where indicated, for other dose levels
Results	information on carcinogenic properties, tumour incidence in relation to dose, latency period, tumour multiplicity, potential for metastasis

Table 5.8. Genotoxicity tests

Gene mutation assays

Tests with prokaryotes

- *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay (OECD Guideline 471)
- *Escherichia coli* reverse mutation assay (OECD Guideline 472)

Tests with eukaryotes

- *Saccharomyces cerevisiae* gene mutation assay (OECD Guideline 480)
- *in vitro* mammalian cell gene mutation assay (OECD Guideline 476)
- *in vivo* sex linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster* (OECD Guideline 477)

Chromosomal damage assays

In vitro tests

- mammalian cytogenic test (OECD Guideline 473)
- chromatid exchange assay in mammalian cells (OECD Guideline 479)

In vivo tests

- mammalian bone marrow cytogenetic test for chromosomal analysis (OECD Guideline 475)
- micronucleus test (OECD Guideline 474)

DNA damage/repair/adduct formation assays

- DNA adduct formation 32P-post coupling [43]
 - DNA repair synthesis in mammalian cells *in vitro* (OECD Guideline 482)
 - DNA repair test in primary liver cells [44]
 - DNA repair *in vivo* [44]
-

Table 5.9. Types of adverse effects detected in reproductive toxicity [46]

Time and targets at which a substance initiates its toxicity	Examples of adverse effects on
<i>Adult toxicity</i>	<ul style="list-style-type: none"> - libido - behaviour - endocrine function - mating - gamete production - reproductive life span
<i>Maternal toxicity</i> (changing physiology and metabolism during pregnancy and lactation)	<ul style="list-style-type: none"> - susceptibility - ability to nurse - milk quality/quantity
<i>Developmental toxicity</i> Pre-implantation and implantation	<ul style="list-style-type: none"> - fertilization - movement of fertilized ova - implantation - survival of ova
Embryonic development	<ul style="list-style-type: none"> - growth and differentiation - organ development - survival
Placental development	<ul style="list-style-type: none"> - growth - organ function
Foetal development	<ul style="list-style-type: none"> - growth and differentiation - organ function - survival
Postnatal development (neonatal, pre-weaning, post-weaning, puberty)	<ul style="list-style-type: none"> - birth weight - organ function - hormone function - immune function - CNS and peripheral NS function - sexual function - other cellular functions (transplacental carcinogenesis) - survival

Table 5.10. Approach to the development of *in vitro* test methods that might lead to regulatory acceptance [52]

Step	Requirements
Scientific justification	<ol style="list-style-type: none"> 1. Select simple endpoint essential for hazard identification 2. Develop <i>in vitro</i> assays for these endpoints 3. Understand the mechanism of the <i>in vitro</i> assay and demonstrate similarities to the target event 4. Publish the assay(s) in a high quality peer-reviewed journal
Database development	<ol style="list-style-type: none"> 5. Conduct the <i>in vitro</i> assays parallel to the relevant <i>in vivo</i> studies 6. Conduct and report all studies fully in accordance with GLP 7. Integrate results of the <i>in vitro</i> assays in dossiers submitted to regulatory agencies 8. Propose the <i>in vitro</i> assays to the OECD to be considered for test guideline development

MECCANISMI BIOCHIMICI DELLA TOSSICITA'

Quali sono i meccanismi e le reazioni tramite le quali i composti xenobiotici e i loro metaboliti interagiscono con le biomolecole per causare un effetto tossicologico avverso?

Per generare una risposta tossica, le sostanze devono essere spesso molto reattive

-> se introdotte direttamente nell'organismo, reagirebbero prima di raggiungere un bersaglio in dove causare l'effetto avverso.

-> se prodotte metabolicamente, possono trovarsi in un sito in cui interagire facilmente con le biomolecole, membrane o tessuti per causare la risposta tossica

Si possono identificare 4 categorie di specie tossiche in base alla reattività

- 1) **Specie elettrofile:** caricate positivamente o con cariche parziali positive -> hanno tendenza a legare atomi o gruppi funzionali ricchi di elettroni (N, O ed S che son abbondanti in acidi nucleici, proteine (tra le quali ci son gli enzimi)). Comuni.
- 2) **Specie nucleofile:** caricate negativamente o con cariche parziali negative -> hanno tendenza a legare atomi o gruppi funzionali poveri di elettroni. Meno comuni (es. CO metabolico formato da dealogenazione ed ossidazione di alometani -> lega con Fe^{2+} di emoglobina, impedisce trasporto O_2 ; CN^- prodotto da metabolismo di acrilonitrile -> lega con Fe^{3+} di ferricitocromo ossidasi, impedisce respirazione).

Si possono identificare 4 categorie di specie tossiche in base alla reattività

- 3) Radicali liberi:** specie neutrali o ioniche che hanno elettroni spaiati (es. radical anione superossido $O_2^{\cdot-}$; radicale idrossilico $HO\cdot$, prodotto dalla decomposizione omolitica di H_2O_2 . Queste specie reagiscono con molecole più grandi per generare altri radicali liberi. Trasferimento elettronico da citocromo P 450 a CCl_4 produce $Cl_3C\cdot$ (terribile!).
- 4) Reagenti redox:** possono far decorrere reazioni di ossidoriduzione pericolose (es. $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow$ ossidazione di Fe^{2+} a Fe^{3+} (metemoglobinemia))

Spesso sono importanti le interazioni tra specie tossiche e recettori

Cos'è un recettore?

Nel presente contesto per **recettore** si intende un'entità biochimica che interagisce con una specie tossica per produrre un effetto avverso.

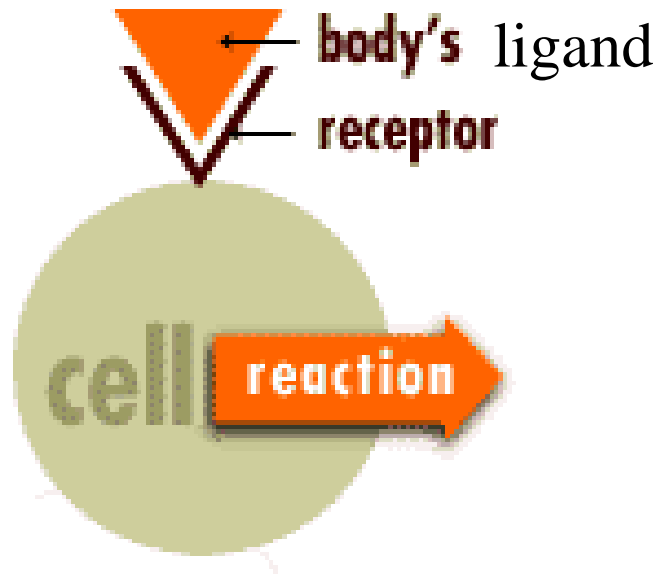
In genere i r. sono macromolecole (come proteine, acidi nucleici o fosfolipidi di membrane cellulari) interne alle o sulla superficie delle cellule.

La sostanza che interagisce con un r. è detta **legante**.

I leganti sono di solito piccole molecole (*endogene* - come gli ormoni – o *xenobiotiche* – come molte sostanze tossiche)

La FUNZIONE del r. dipende dalla sua elevata specificità per particolari leganti; ciò implica spesso un adattamento stereochimico tra recettore e legante
(simile a interazione tra enzima e substrato)

normal



Meccanismo “serratura e chiave”
(*lock and key*)

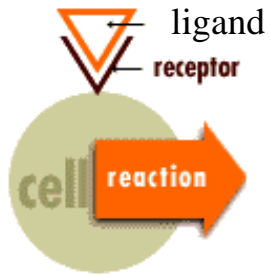
Si noti che reazioni tra r. e tossico sono spesso 100 x più forti di quelle tra enzimi e substrati.

Inoltre mentre gli enzimi alterano un substrato chimicamente (es tramite idrolisi), i tossici non alterano la natura dei recettori se non legandosi ad essi.

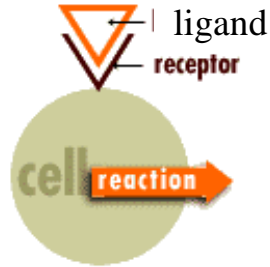
In molti casi l'identità del recettore NON è nota (es. insetticidi piretroidi). In tal caso, per il tossico X, ci si riferisce al recettore X.

Varie interazioni tra tossici e r. sono studiate in analogia con studi farmacologici (ove si studia l'interazione farmaco-recettore).

excessive



insufficient

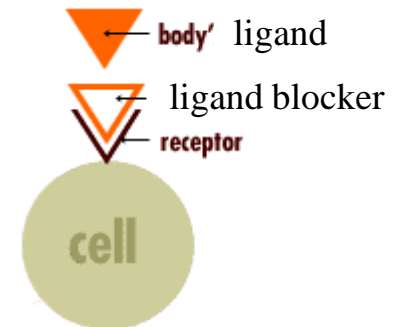


Azione diversa in grado
(effetti avversi)

Azione antagonista

Si verifica anche se legame di tossico con un sito prossimo a r. ma tale che addotto ostacola stericamente il funzionamento di r.

blocked



Il recettore potrebbe anche non avere leganti endogeni

Interferenze con l'azione degli enzimi

Gli enzimi devono funzionare correttamente per far funzionare i processi metabolici essenziali che avvengono nelle cellule.

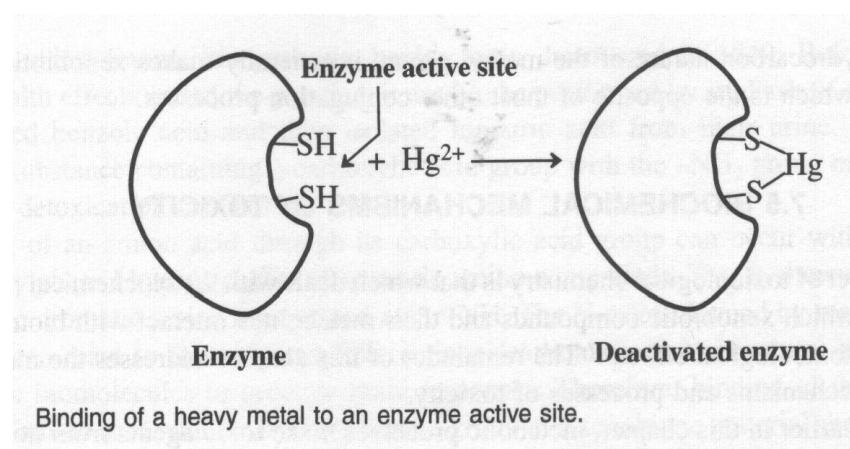
Xenobiotici a volte sono **inibitori di enzimi** che rallentano o bloccano gli e. dall'effettuare la loro normale funzione di catalizzatori biochimici.

L'**induzione enzimatica** è un processo per cui il corpo è stimolato a sintetizzare enzimi per un particolare scopo.

Alcuni inibitori enzimatici sono endogeni per controllare i processi catalizzati da e..

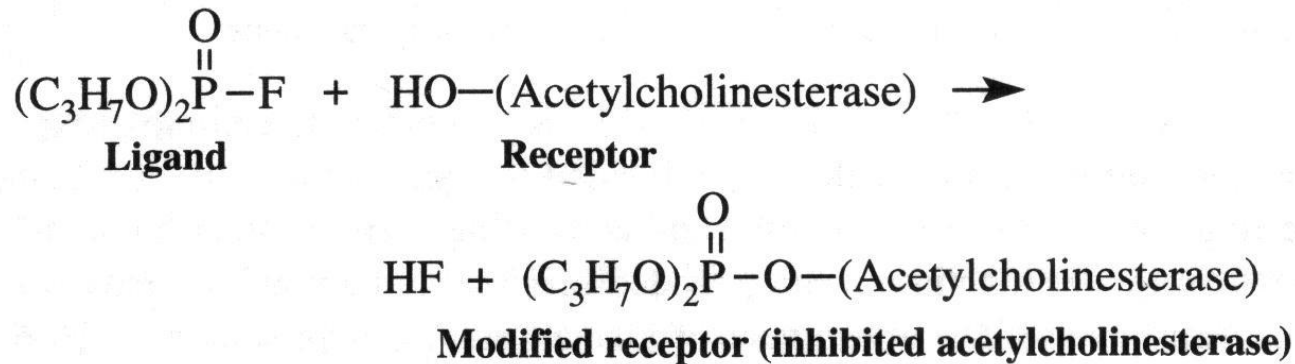
Esempio di inibizione dovuta a specie tossiche:

ioni di metalli pesanti Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} tendono a legarsi fortemente a gruppi funzionali contenenti zolfo ($-\text{SS}-$, $-\text{SH}$, $-\text{S}-\text{CH}_3$) presenti nei siti attivi di e. inibendone il funzionamento.



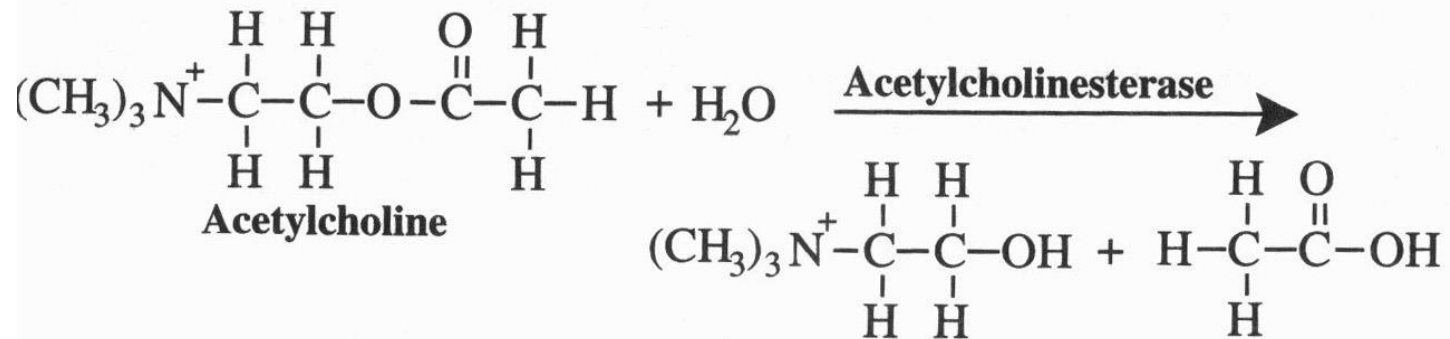
Inibizione di metalloenzimi (e. che contengono un metallo nella loro struttura) avviene spesso per sostituzione del metallo con un m. xenobiotico (es. Cd^{2+} sostituisce Zn^{2+} in ATPasi, alcol deidrogenasi)

Inibizione dovuta a composti organici che formano legami covalenti

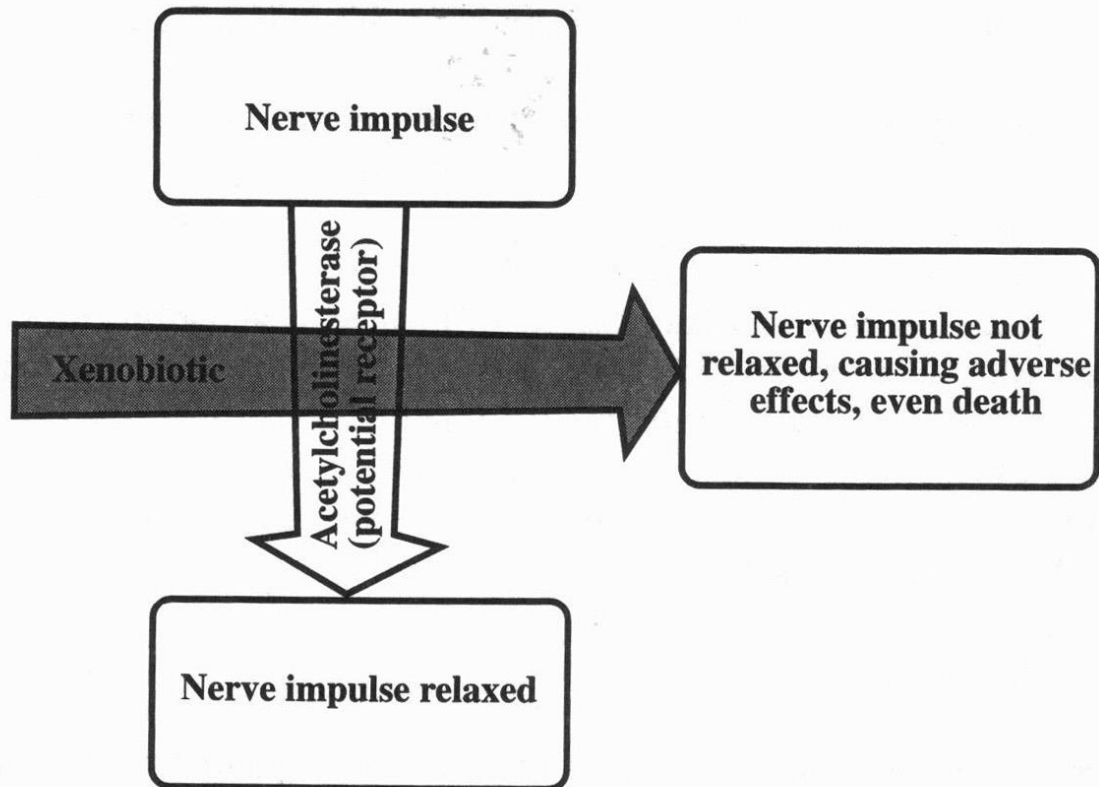


-> Effetti tossici su sistema nervoso
 (il legante è un gas nervino - diisopropilfosfofluoridato)

Tossicologia – recettori e sostanze tossiche



Tossicologia – recettori e sostanze tossiche



Example of a toxicant acting on a receptor to cause an adverse effect. When acetylcholinesterase is bound by a xenobiotic substance, the enzyme does not act to stop nerve impulse. This can result in paralysis of the respiratory system and death.

Biochimica della mutagenesi

La mutagenesi è il fenomeno per cui tratti ereditabili risultano da alterazioni del DNA

Mutazioni avvengono normalmente originando la diversità nelle specie, ma molte mutazioni sono dannose.

Specie tossiche che causano mutazioni son dette **mutagene** (spesso le stesse che causano tumori ed teratogenesi).

DNA contiene basi azotate *adenina, guanina citosina e timina*; l'ordine in cui si presentan nel DNA determina la struttura del RNA, sostanza prodotta per sintetizzare nuove proteine ed enzimi nelle cellule. Cambiare, aggiungere o sottrarre una qualsiasi di queste basi azotate altera la natura del RNA prodotto e può cambiare processi biologici vitali. Questo fenomeno, che può esser indotto da uno xenobiotico, è una mutazione che può esser passata alla progenie spesso con effetti deleteri.

Es. mutagenicità dell'acido nitrico nei batteri.

Tre basi azotate (A, G, C) contengono un amino gruppo $-NH_2$

l'acido nitrico rimpiazza amino- gruppi con atomi di ossigeno con legami doppi, poi inserisce un cheto gruppo ($C=O$) negli anelli delle basi azotate convertendole in altri composti (-> il DNA può non funzionare bene -> mutazione)

Alchilazioni possono inserire un piccolo gruppo alchilico (metile o etile) su di un N di basi azotate

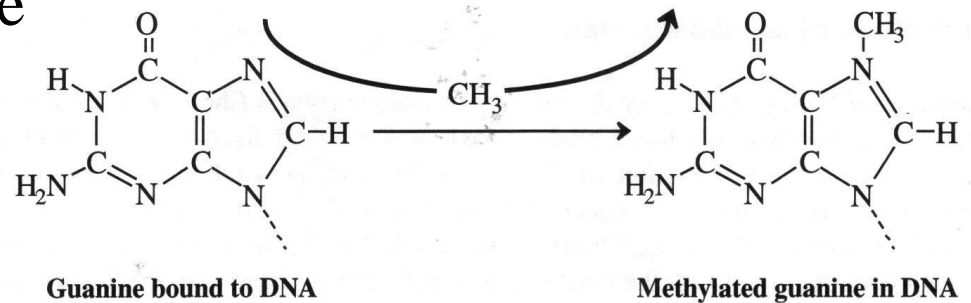


Figure 7.14 Alkylation of guanine in DNA.

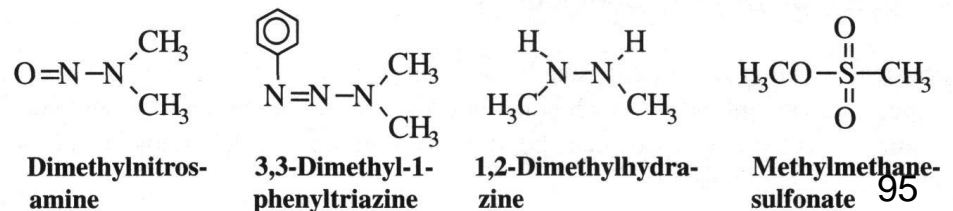
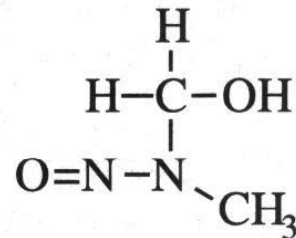
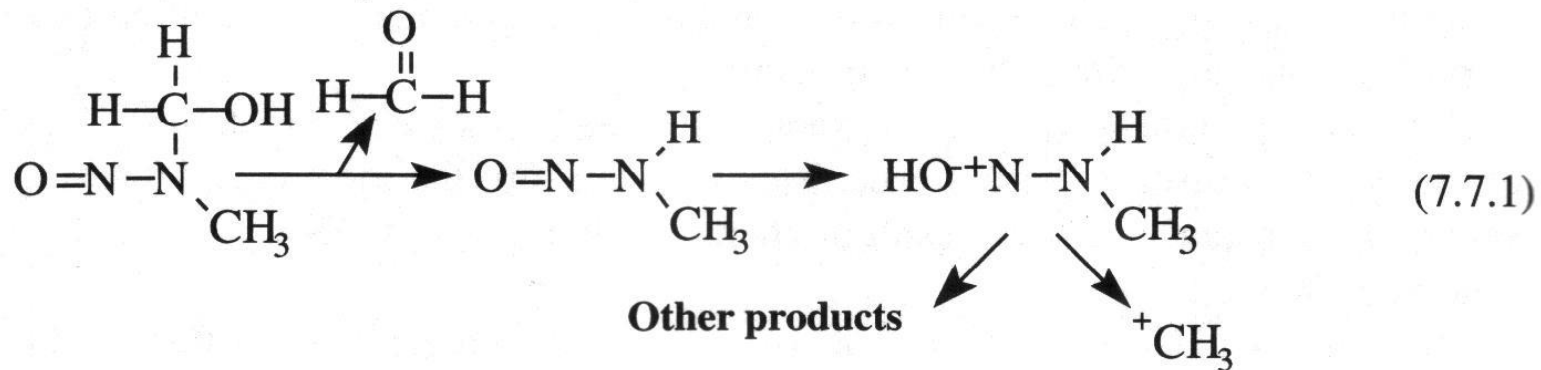


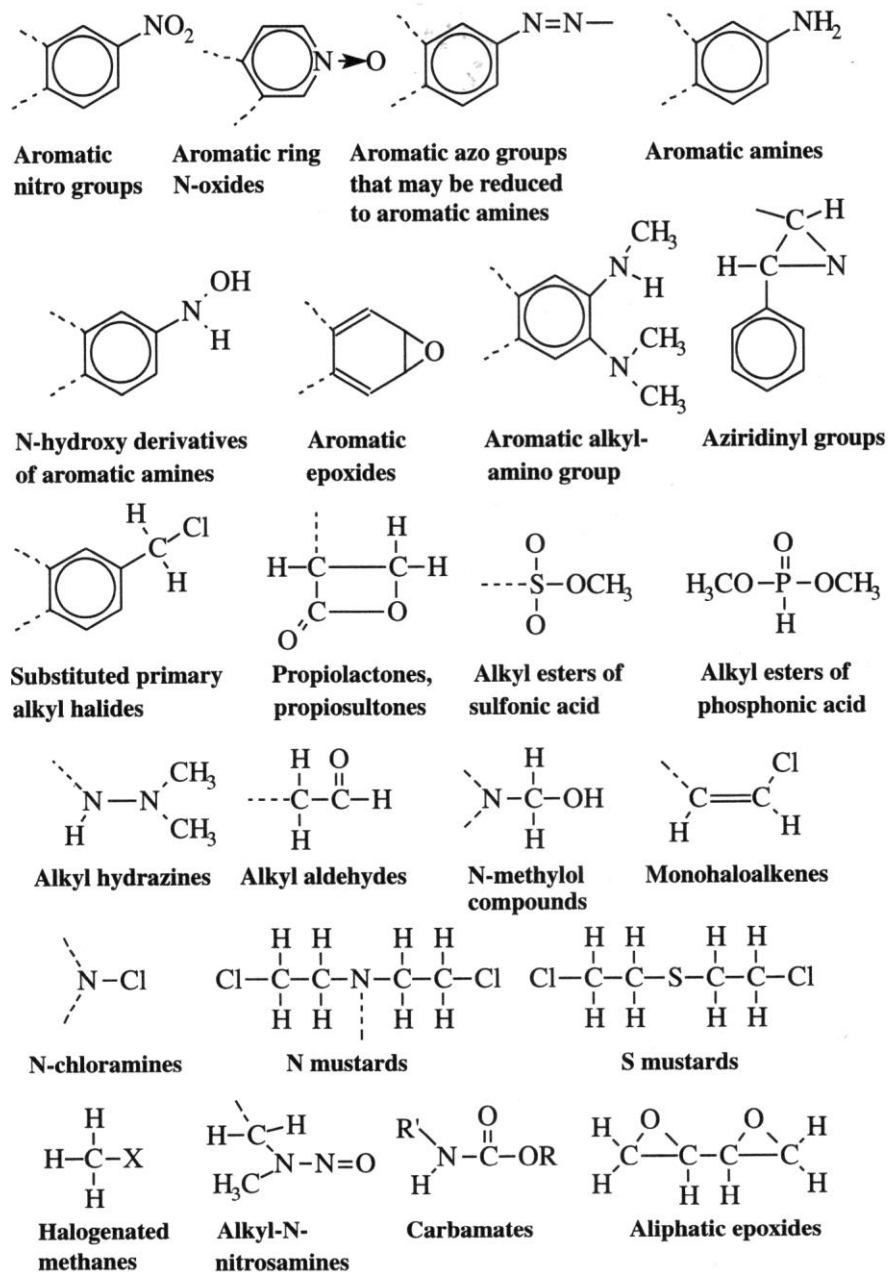
Figure 7.15 Examples of simple alkylating agents capable of causing mutations.

Es. Dimetil nitrosamina è attivata dal NADPH generando intermedio reattivo



This product undergoes several nonenzymatic transitions, losing formaldehyde and generating a carbonium ion, $^+\text{CH}_3$, that can methylate nitrogenous bases on DNA:





8.4 Functionalities commonly associated with genotoxicity and mutagenicity. These groups are used in structure-activity relationships to alert for possible carcinogenic substances.

Biochimica della cancerogenesi

Il cancro è una condizione caratterizzata dalla replica e crescita incontrollata delle cellule di un corpo (cellule somatiche)

Agenti cancerogeni:

chimici (es. nitrosamine o IPA)

biologici (es. alcuni virus)

radiazioni ionizzanti (es. raggi X)

fattori genetici (es. selezioni genetiche)

La cancerogenesi chimica è prodotta da specie chimiche xenobiotiche

Storia: 1775 spazzacamini inglesi e cancro allo scroto <- fuliggine e catrame

Lavoratori nelle industrie di coloranti (D) e cancro alla vescica dovuto a prodotti estratti dal catrame (exp.  2-Naphthylamine)

Due passaggi principali nella cancerogenesi chimica:

iniziazione e promozione

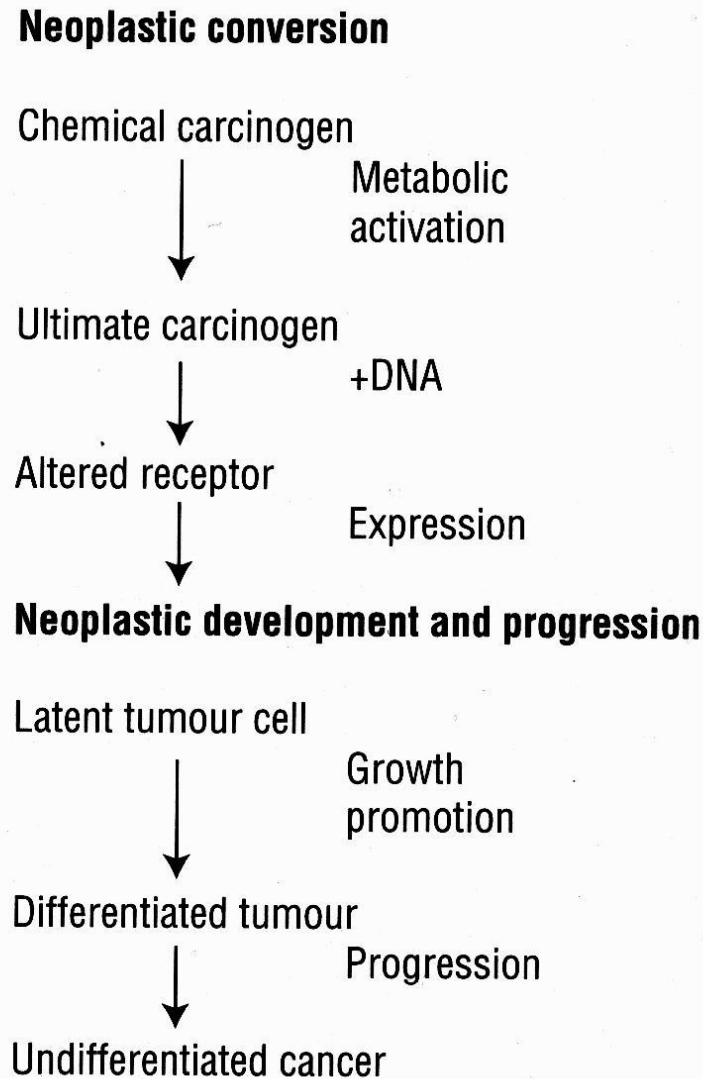


Figure 5.7. Neoplastic conversion, development and progression. From Williams [71]. With permission.

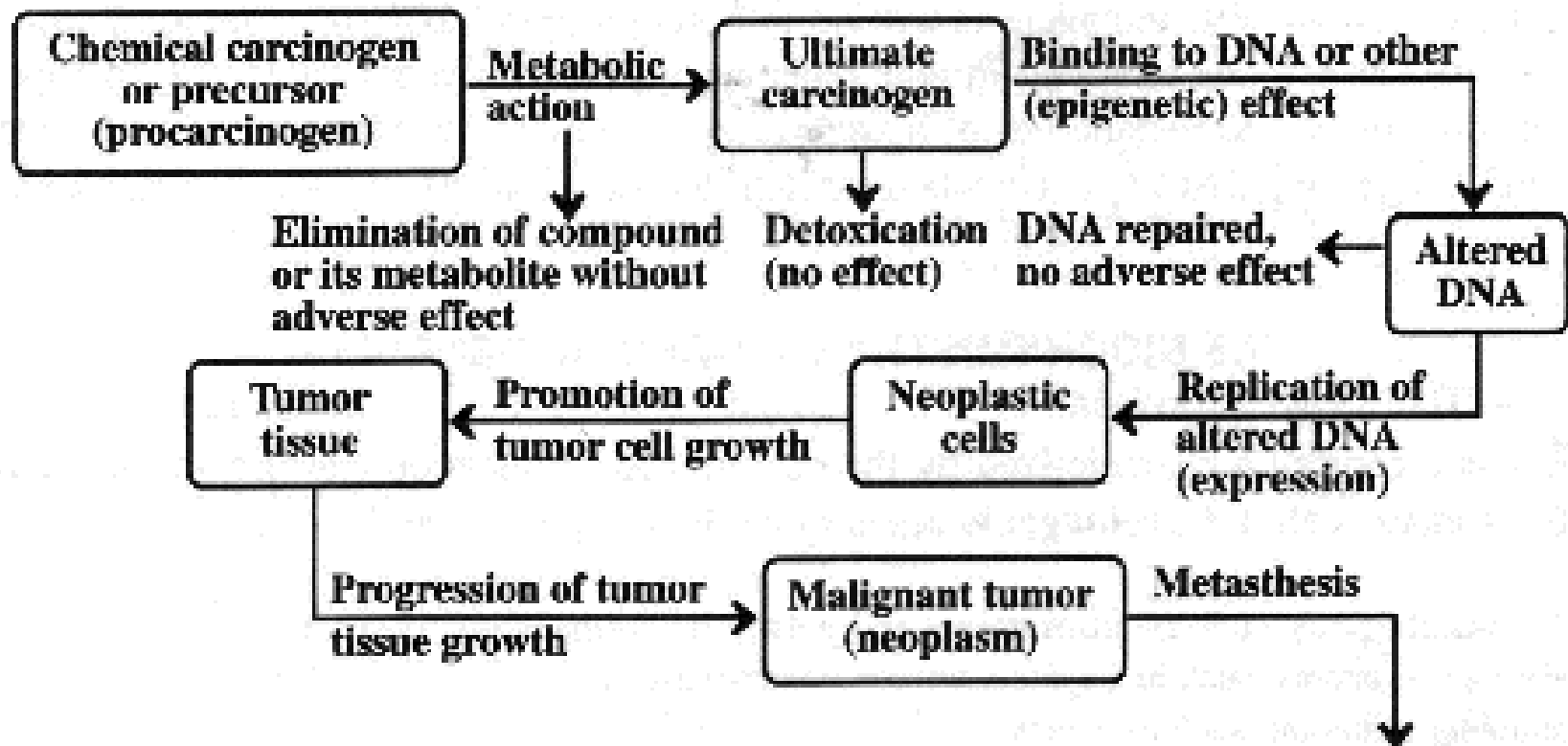
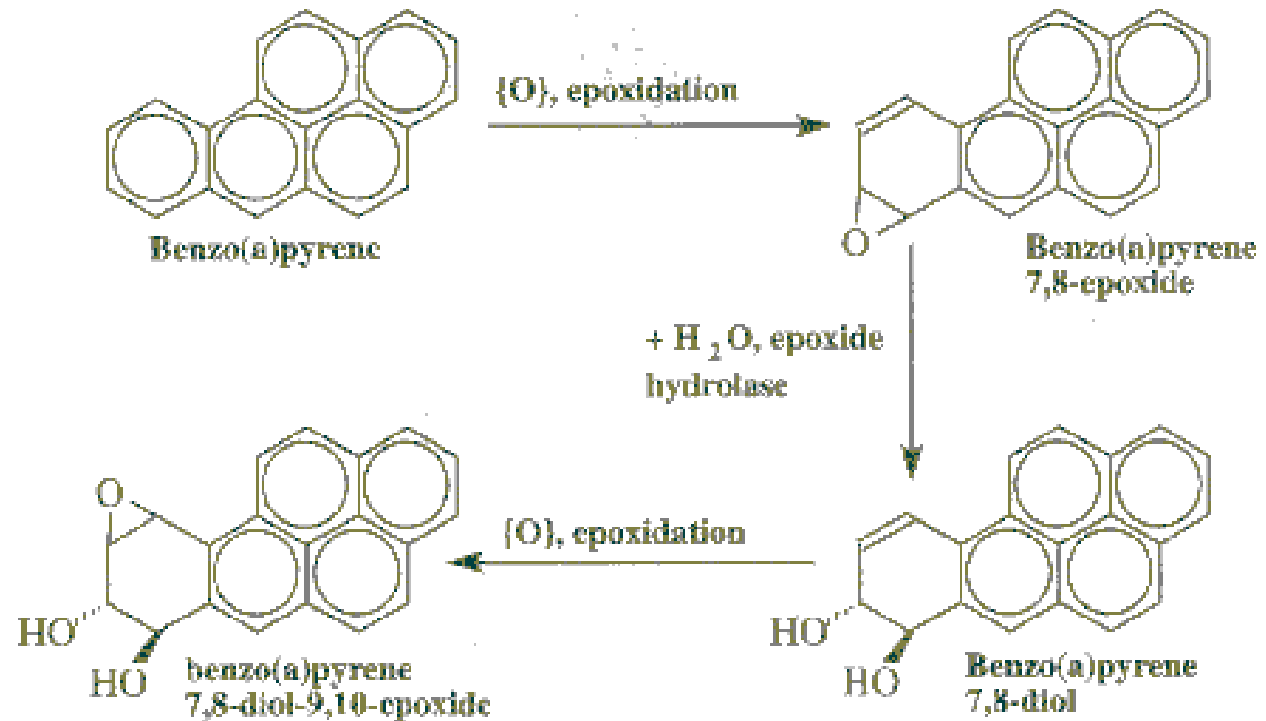


Figure 7.16 Outline of the carcinogenic process.

Es. specie procancerogene - cancerogene prossimali (*proximate c.*) -
cancerogene definitive (? - *ultimate carcinogen*)

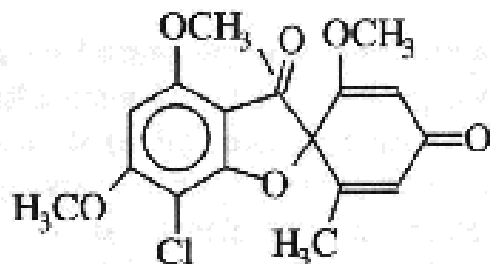
idratazione degli epossidi

trans diidrodoli, a volte meno tossici perchè meno reattivi
degli epossidi, ma benzo(a) pirene è procancerogeno,
-> prodotto cancerogeno

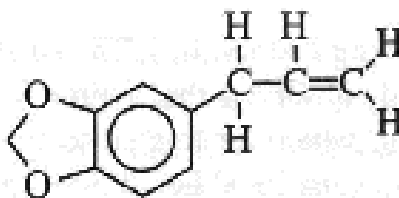


- 3 Epoxidation and hydroxylation of benzo(a)pyrene (left) to form carcinogenic benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide.

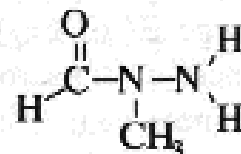
Naturally occurring carcinogens that require bioactivation



Griseofulvin (produced by *Penicillium griseofulvum*)

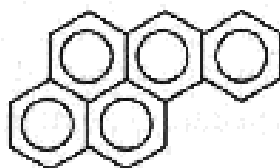


Saffrole (from sassafras)

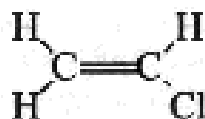


N-methyl-N-formylhydrazine (from edible false morel mushroom)

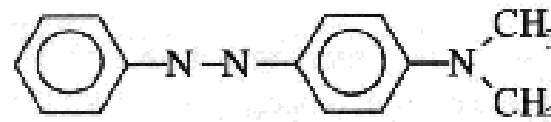
Synthetic carcinogens that require bioactivation



Benzo(a)pyrene

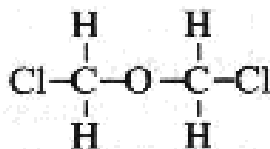


Vinyl chloride

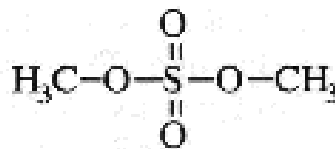


4-dimethylaminoazobenzene

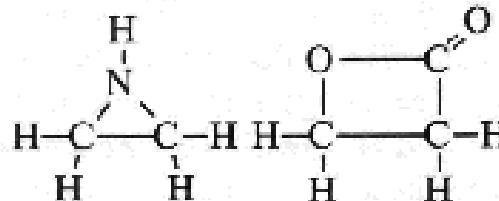
Primary carcinogens that do not require bioactivation



Bis(chloromethyl)-ether



Dimethyl sulfate



Ethyleneimine

β -Propioacetone

Figure 7.17 Examples of the major classes of naturally occurring and synthetic carcinogens, some of which require bioactivation and others of which act directly.

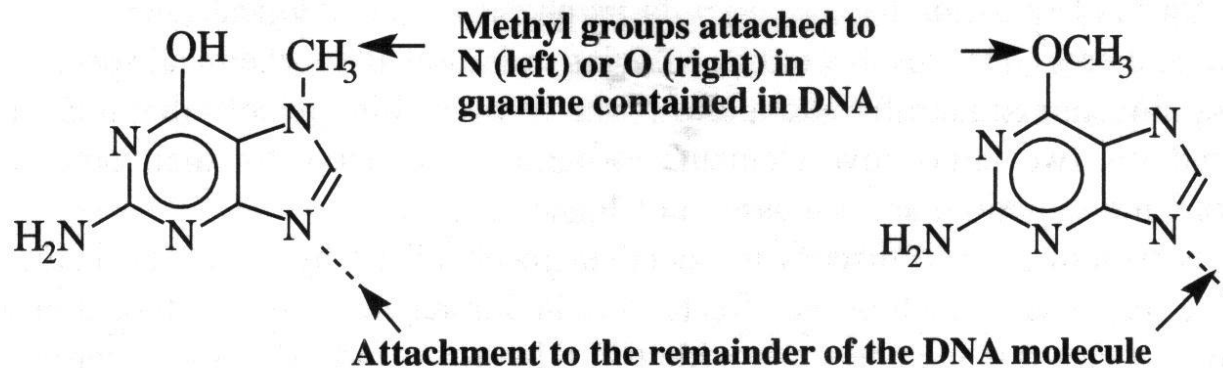
Cancerogeni epigenetici

promotori - agiscono dopo la fase di iniziazione (es. aumentano il numero di cellule tumorali - diminuiscono il tempo di latenza)

non iniziano la cancerogenesi / non sono elettrofili / non si legano al DNA

Agenti alchilanti nella cancerogenesi

cancerogeni possono formare legami covalenti con proteine, peptidi, RNA e DNA. Sono gli addotti con il DNA ad essere significativi nell'iniziare la cancerogenesi.



8 Alkylated (methylated) forms of the nitrogenous base guanine.

Agenti alchilanti (inseriscono gruppi metilici o etilici) o arilanti (fenili) per il DNA. Spesso si formano metabolicamente (es. dimetil nitrosammina)

Test sulla cancerogenicità

- studi epidemiologici
- test su animali, risultati estrapolati a esseri umani
- per screening: Ames test (mutagenicità - batteri di un ceppo di Salmonella, mutato geneticamente in modo che non sintetizzi l'aminoacido essenziale istidina, esposti a specie da testare; *se* si ha ritorno a specie originaria/naturale che sintetizza istidina *allora* in ambiente privo di i. verifico crescita di Salmonelle, *allora* la specie testata è mutagena)

Tossicologia – tossificazione e detossificazione

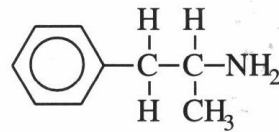
Composto genitore attivo

Metabolita attivo.

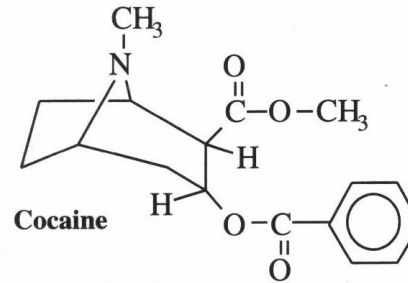
Effetti additivi / sinergici / di potenziamento /

Effetti antagonisti / “blockers” (competizione per un sito)

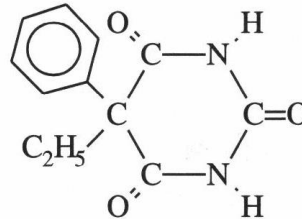
Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



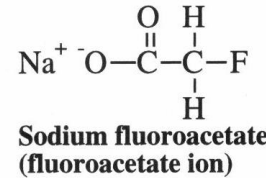
**Amphetamine
(benzedrine)**



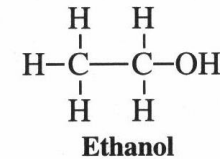
Cocaine



**Phenobarbital
(a barbiturate)**

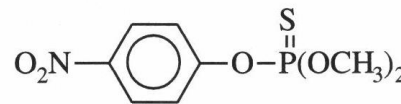


**Sodium fluoroacetate
(fluoroacetate ion)**

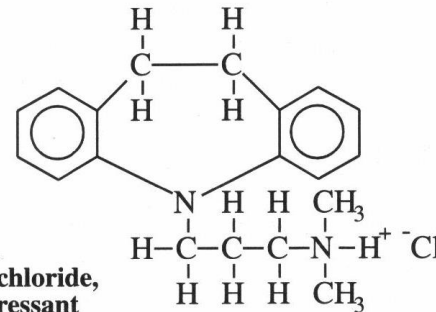


Ethanol

Examples of toxicants that affect body temperature. Amphetamine, cocaine, and fluoroacetate increase body temperature; phenobarbital and ethanol decrease it.



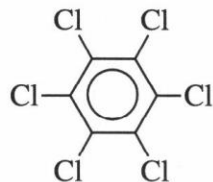
Methyl parathion



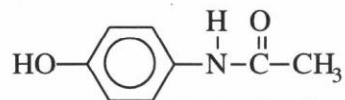
**Imiprimine hydrochloride,
a tricyclic antidepressant**

Structures of toxicants that can affect pulse rate. Methyl parathion, a commonly used plant insecticide, can cause bradycardia. Imiprimine hydrochloride, a tricyclic antidepressant, can cause either tachycardia or arrhythmia.

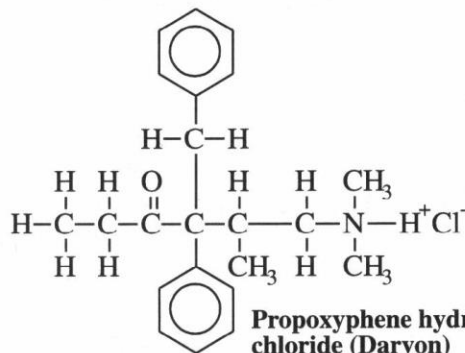
Tossicologia – risposte fisiologiche e comportamentali



Hexachlorobenzene

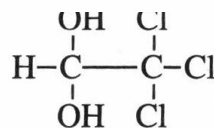


Acetaminophen

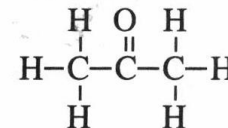


Propoxyphene hydrochloride (Darvon)

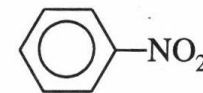
Some compounds that affect respiratory rate. Acetaminophen is one of the simple analgesics, which in therapeutic doses relieves pain without any effect on an individual's consciousness. Propoxyphene hydrochloride is a narcotic analgesic, a class of substances that can cause biochemical changes in the body leading to chemical dependency.



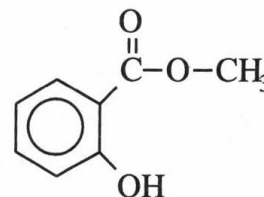
**Chloral hydrate
(pear odor)**



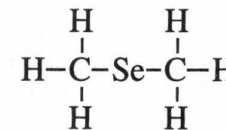
**Acetone
(acetone odor)**



**Nitrobenzene
(shoe polish)**



**Methyl salicylate
(wintergreen)**



**Dimethyl selenide
(garlic)**

Some toxicants and the odors they produce in exposed subjects.

Tossicologia – effetti riproduttivi e sullo sviluppo

Effetti tossici sullo sviluppo

Effetti teratogeni (talidomide) (primo trimestre di gravidanza)

Effetti sul sistema riproduttivo

Effetti mutageni (alterazione del DNA)

Studi sulla tossicità

Molti aspetti critici ci si riferisce spesso alla “bibbia” gialla del WHO/OMS “*Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals: Part I*”;

Indicazioni sono reperibili anche su “*Guidelines for testing chemicals*” dell’OECD/OCSE

Bada a:

- Proprietà chimiche

- vie d’esposizione

- Selezione e cura degli animali (dieta e condizioni di stabulazione)

- Acquisizione dei dati e presentazione e interpretazione dei risultati

- Good laboratory practices (US-FDA, USEPA, OECD, EC)*

Incertezze nei test su animali *UN International Program on Chemical Safety (1978)*

Test di tossicità acuta

Table 5.2. Acute toxicity tests

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, dermal, inhalatory
Experimental animals	rat, (mouse), rabbit, guinea pig, (dog)
Number of animals	5 of each sex per group
Dose levels	control and at least 3 or more if necessary for calculating LD50 or LC50 ^a
Examinations	<ul style="list-style-type: none">- clinical examination for signs of toxicity or death- gross examination- histopathological examination if indicated
Results	the LD50 or LC50 value for each sex at 95% confidence interval

^a If a dose of 2000 mg/kg_{bw} does not cause acute toxicity and compound-related mortality, a full study may not be necessary.

Table 5.4. Evaluation and interpretation of results of acute toxicity tests (fixed dose procedure)

Dose	Results	Interpretation
5 mg/kg _{bw}	less than 100% survival	compounds which are <i>very toxic</i>
	100% survival; but evident toxicity	compounds which are <i>toxic</i>
	100% survival; no evident toxicity	see results at 50 mg/kg
50 mg/kg _{bw}	less than 100% survival	compounds which may be <i>toxic</i> or <i>very toxic</i> ; see results at 5 mg/kg
	100% survival; but evident toxicity	compounds which are <i>harmful</i>
	100% survival; no evident toxicity	see results at 500 mg/kg
500 mg/kg _{bw}	less than 100% survival	compounds which may be <i>toxic</i> or <i>harmful</i> ; see results at 50 mg/kg
	100% survival; but evident toxicity	compounds considered as having no significant acute toxicity
	100% survival; no evident toxicity	see results at 2000 mg/kg
2000 mg/kg _{bw}	less than 100% survival	see results at 500 mg/kg
	100% survival; with or without evident toxicity	compounds which do not have significant acute toxicity

Table 5.5. Repeated dose studies (28 and 90 d)

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, dermal, inhalatory
Experimental animals	rat (mouse, dog)
Number of animals	5 to 10 of each sex per group ^a
Dose levels	control and at least 3 dose levels with an increment of 2 to 10 (sometimes satellite groups)
Examinations	<ul style="list-style-type: none"> - body weight, food consumption and water consumption - clinical examination. haematological parameters: haematocrit, haemoglobin concentration, erythrocyte counts, total and differential leukocyte count, clotting potential; biochemical parameters: including organ function, parameters, electrolyte balance, carbohydrate metabolism, serum salts (Ca, P, Na, K, Cl), glucose, serum enzymes, urea nitrogen, albumen, serum protein, creatinin, bilirubin (lipids, hormones, methaemoglobin, choline-esterase activity), urine analysis - gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy - organ weights - histopathological examination: of all preserved organs and tissues (30 or more) of highest dose and control. If indicated, intermediate and low dose groups
Results	information concerning effects of repeated dose exposure for parameters measured, target organ(s); if possible, mechanism of action and NOAEL

^a For a range finding test 5 animals per sex per group may be sufficient for experiments with dogs, usually groups of 4 to 5 animals per sex are used.

Table 5.6. Chronic toxicity studies (6 to 24 months)

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, inhalatory
Experimental animals	rat (mouse, dog)
Number of animals	20 (dogs 4 to 5) per sex per group
Dose levels	control and at least 3 dose levels with an increment of 2 to 10 (sometimes satellite groups)
Examinations	<ul style="list-style-type: none">- body weight, food consumption and water consumption during the first 13 weeks at weekly intervals and later at 4 week intervals (body weight) or 3 month intervals (food and water consumption)- clinical examination: haematological and biochemical examination and urine analysis (Table 5.5) at onset of study and at 6 month intervals- gross examination: daily observation and extensive examination at autopsy- organ weights- histopathological examination in full of all preserved organs and tissues of highest dose and controls. If indicated, of intermediate and lowest dose
Results	information concerning effects of repeated dose exposure on parameters studied, target organ(s); if possible, mechanism of toxicity and NOAEL

Table 5.7. Carcinogenicity studies

Conditions	chemical identification of substance, its purity and chemical characteristics
Route	oral, inhalatory
Experimental animals	rat, mouse, (dog), (monkey)
Number of animals	50 per sex per group (sometimes satellite groups); dogs and monkeys usually not more than 7 to 10 per group
Dose levels	control and at least 3 dose groups, for proper quantitative risk assessment more dose groups
Examinations	<ul style="list-style-type: none">- body weight, food consumption and water consumption at various intervals (see Table 5.6)- clinical examination at intervals (see Table 5.6) of 10 to 20 animals per sex per group- gross examination: daily observation and extensive gross examination on termination- histopathological examination in full of highest dose and controls where indicated, for other dose levels
Results	information on carcinogenic properties, tumour incidence in relation to dose, latency period, tumour multiplicity, potential for metastasis

Table 5.8. Genotoxicity tests

Gene mutation assays

Tests with prokaryotes

- *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay (OECD Guideline 471)
- *Escherichia coli* reverse mutation assay (OECD Guideline 472)

Tests with eukaryotes

- *Saccharomyces cerevisiae* gene mutation assay (OECD Guideline 480)
- *in vitro* mammalian cell gene mutation assay (OECD Guideline 476)
- *in vivo* sex linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster* (OECD Guideline 477)

Chromosomal damage assays

In vitro tests

- mammalian cytogenic test (OECD Guideline 473)
- chromatid exchange assay in mammalian cells (OECD Guideline 479)

In vivo tests

- mammalian bone marrow cytogenetic test for chromosomal analysis (OECD Guideline 475)
- micronucleus test (OECD Guideline 474)

DNA damage/repair/adduct formation assays

- DNA adduct formation 32P-post coupling [43]
 - DNA repair synthesis in mammalian cells *in vitro* (OECD Guideline 482)
 - DNA repair test in primary liver cells [44]
 - DNA repair *in vivo* [44]
-

Table 5.9. Types of adverse effects detected in reproductive toxicity [46]

Time and targets at which a substance initiates its toxicity	Examples of adverse effects on
<i>Adult toxicity</i>	<ul style="list-style-type: none"> - libido - behaviour - endocrine function - mating - gamete production - reproductive life span
<i>Maternal toxicity</i> (changing physiology and metabolism during pregnancy and lactation)	<ul style="list-style-type: none"> - susceptibility - ability to nurse - milk quality/quantity
<i>Developmental toxicity</i> Pre-implantation and implantation	<ul style="list-style-type: none"> - fertilization - movement of fertilized ova - implantation - survival of ova
Embryonic development	<ul style="list-style-type: none"> - growth and differentiation - organ development - survival
Placental development	<ul style="list-style-type: none"> - growth - organ function
Foetal development	<ul style="list-style-type: none"> - growth and differentiation - organ function - survival
Postnatal development (neonatal, pre-weaning, post-weaning, puberty)	<ul style="list-style-type: none"> - birth weight - organ function - hormone function - immune function - CNS and peripheral NS function - sexual function - other cellular functions (transplacental carcinogenesis) - survival

Table 5.10. Approach to the development of *in vitro* test methods that might lead to regulatory acceptance [52]

Step	Requirements
Scientific justification	<ol style="list-style-type: none"> 1. Select simple endpoint essential for hazard identification 2. Develop <i>in vitro</i> assays for these endpoints 3. Understand the mechanism of the <i>in vitro</i> assay and demonstrate similarities to the target event 4. Publish the assay(s) in a high quality peer-reviewed journal
Database development	<ol style="list-style-type: none"> 5. Conduct the <i>in vitro</i> assays parallel to the relevant <i>in vivo</i> studies 6. Conduct and report all studies fully in accordance with GLP 7. Integrate results of the <i>in vitro</i> assays in dossiers submitted to regulatory agencies 8. Propose the <i>in vitro</i> assays to the OECD to be considered for test guideline development

Table 5.11. Estimated conversion factors between an LD50, the NOEL of a subchronic or chronic study and the acceptable daily intake (ADI)

LD50	NOEL subchronic	NOEL chronic	ADI
100,000 - 5,000,000	300 - 1000	100	1

Table 5.12. Actual intake and safety margin for a number of substances, adapted after Kroes and Feron [59]

Substances		Actual daily intake	Safety margin
Fat	(en %) ^a	40	<2
Sugar	(g)	100	2-3
Nicotin acid	(mg)	20 ^b	50
Vitamin A	(IE)	5000 ^b	18
Selenium	(mg)	1 ^b	10
Tocopherol	(mg)	0.15-2	60-6
Vitamin D	(IE)	400 ^b	5
Fluor	(mg)	1 ^b	5
NaCl	(g)	9	<2
Mercury	(μ g)	63	50
Sulphite	(mg)	3	1400
Bromide	(mg)	9.4	10
Solanin	(mg)	1	2
Dietary fibre	(g)	20-30 ^a	2
Aspartame	(mg)	300	800
DDT	(μ g)	6	5000
Dieldrin	(μ g)	0.5	1200
Lindane	(μ g)	2	30000
Dioxins	(pg)	135	500

^a Energy percents.

^b Recommended daily intake.