

Bijlage 3. Studie wetenschappelijke literatuur m.b.t. de genotoxiciteit van chloorpyrifos

In de EFSA verklaring van 31.07.2019 na de EU Peer Review (EFSA, 2019c) werd aangegeven dat voor chloorpyrifos geen referentiedosissen konden worden bepaald, gelet op de vastgestelde effecten op het vlak van mutageniciteit en ontwikkelingsneurotoxiciteit (dit laatste leidde tot het voorstel voor indeling als Repr. 1B).

In de EU Peer Review werd vastgesteld dat op basis van het grootste deel van door de aanvrager ingediende GLP-regulatorische genotoxiciteitsstudies, chloorpyrifos niet kon ingedeeld worden als genotoxisch. Zowel de testen op bacteriën en zoogdiercellen wezen niet op enig potentieel voor genmutatie. Chloorpyrifos testte negatief voor chromosoomaberraties, zowel *in vitro* als *in vivo*.

In de open wetenschappelijke literatuur werden toch een aantal studies gevonden (die aanvaardbaar werden bevonden ongeacht enkele restricties) die in tegenspraak waren met de GLP-studies, en er werd hierdoor besloten dat een mogelijk genotoxisch potentieel niet uitgesloten was.

Op basis van studies beschikbaar in de open wetenschappelijke literatuur werden de gegevens m.b.t. genotoxiciteit nader geanalyseerd om na te gaan of er een besluit zou kunnen getrokken worden m.b.t. een mogelijk werkingsmechanisme voor de vastgestelde effecten in deze studies (Tabel 3).

In het EU evaluatierapport worden vier *in vivo* testen beoordeeld uit de open wetenschappelijke literatuur. In één van deze (Abdelaziz *et al.*, 2010) rapporteren de auteurs een verhoogde incidentie van chromosoomaberraties in zowel beenmergcellen als geslachtscellen van de ♂ muis na een blootstelling aan de werkzame stof gedurende 90 dagen.

In de drie andere rapporten worden verhoogde incidenties gerapporteerd in de komeetttest in verschillende weefsels zoals witte bloedcellen, hepatocyten en hersencellen (Kopjar *et al.*, 2018; Sandhu *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2008). In één publicatie werd een verhoging vastgesteld van de incidentie van tweekernige en meerkernige cellen, waarvoor de genotoxicologische relevantie echter onduidelijk blijft (Sandhu *et al.*, 2013).

Ondersteunend bewijs werd gevonden in twee *in vitro* studies. In Cui *et al.* (2011) vinden de auteurs eveneens verhoogde incidenties van DNA-schade via de komeetttest, en ongeplande DNA-synthese (UDS) in hepatocyten. In een recent artikel, wegens de recente publicatiedatum niet opgenomen in het EU evaluatierapport (Mužinić *et al.*, 2019), werd evenwel geen verhoogde micronucleus-incidentie gevonden in menselijke lymfocyten, maar wel evidentie van non-disjunctie in tweekernige interfasecellen voor 4 verschillende merkerchromosomen, gelabeld met de FISH of 'fluorescentie *in situ* hybridisatie' technologie. Een sluitende verklaring voor het paradoxale feit van mogelijke interactie met het cel/kerndelingssysteem zonder micronucleusvorming wordt niet gegeven, maar er wordt gesuggereerd dat dit laatste het gevolg zou kunnen zijn van een aantal moleculaire mechanismen die de cohesie van de zusterchromatiden tijdens de kern/celdeling verstoren zonder uitstoot van extra chromosomen. Een gevalideerd systeem om dit te bevestigen is tot nog toe onvoldoende aanwezig. Bovendien is de lacune in deze studie dat door de keuze van de testconcentraties geen duidelijke concentratie-respons werd vastgesteld, wat de studie tot op een bepaalde hoogte niet overtuigend maakt.

Tabel 3. Overzicht van de belangrijkste literatuurgegevens m.b.t. de genotoxiciteit van chloorpyrifos.

Test type , GLP, Test substance (purity)	Test system, Route of administration (solvent), Duration, Concentrations / doses	Evaluation/ Result	Reference
In vivo comet assay: DNA damage, liver and brain (similar to OECD 489, no GLP) Chlorpyrifos purity not reported	♂ rats (Wistar) Intramuscular injection - not preferred) (solvent DMSO) Dose levels: 0, 50, 100 mg/kg bw/d for 1, 2 or 3 days, or 0, 1.12 or 2.24 mg/kg bw/d for 90 days.	Acceptable with restriction ↑ comet incidence brain + liver cells LOAEL (90d) = 1.12 mg/kg bw/d	Mehta <i>et al.</i> , 2008
In vivo chromosome aberration in somatic and germ cells (similar to OECD 475 and 483, no GLP) Chlorpyrifos purity not reported	♂ mice (Swiss Albino), oral gavage for 90 days (solvent <i>a.d.</i> , suboptimal given log $P_{ow} \sim 5$) Dose levels: 0, 0.5, 1, 2 mg/kg bw/d	Acceptable with restriction (positive control displays a relative low response) ↑ Chromosome aberration in somatic + germ cells. LOAEL (90d) = 0.5 mg/kg bw/d	Abdelaziz <i>et al.</i> , 2010
In vivo nuclear abnormality (binuclear, multinuclear induction – non-standard) test and comet assay in lymphocytes (no guideline, no GLP) Chlorpyrifos purity 99.2%	♂ + ♀ rats (Wistar) Oral gavage (solvent corn oil) for 7 or 14 days Dose-levels: 0, 3 or 12 mg/kg bw/d	Acceptable with restriction ↑ binuclear, multinuclear cell incidence (geno- toxicological relevance?) ↑ comet incidence in lymphocytes LOAEL (14d) = 3 mg/kg bw/d	Sandhu <i>et al.</i> , 2013
In vivo comet assay: DNA damage, leukocytes and brain cells (similar to OECD 489, no GLP) Chlorpyrifos purity 99.9%	♂ rats (Wistar), oral gavage for 28 days (solvent EtOH except ctr: saline) Dose levels: 0, 0.01, 0.015, 0.160 mg/kg bw/d (=no significant AChE-inhibition in brain; no clinical signs; RBC AChE affected at all doses)	Acceptable with restriction (solvent ≠ in control <> treated animals) ↑ comet incidence in brain + leukocytes but concentration-dependence unclear LOAEL (28d) = 0.01-0.16 mg/kg bw/d (?)	Kopjar <i>et al.</i> , 2018
In vitro UDS assay (similar to OECD 482, no GLP) In vitro comet assay (similar to OECD 487, no GLP) In vitro test for DNA cytosine methylation Chlorpyrifos purity 95.6 %	Triplicate cultures of ICR mouse hepatocytes treated with chlorpyrifos (in DMSO) at 0, 3.1, 6.3, 12.5, 25 or 50 µg/mL.	Acceptable with restriction Concentration-related ↑ comet incidence in hepatocytes ↓ levels of 5-methylcytosine (DNA methylation assay, epigenetic effect?)	Cui <i>et al.</i> , 2011
In vitro cytome assay (similar to OECD 487, no GLP) In vitro FISH analysis of nondisjunction and aneuploidy in BN cells (chr #9, #18,X,Y) Chlorpyrifos purity not reported	Single (?) cultures of human lymphocytes treated with chlorpyrifos (in DMSO) at 0°, 0.000623°, 0.01666, 0.0262, or 3° µg/mL. (°: concentration tested in FISH)	Acceptable with reservation (only 1 ♂ donor, 1 culture/concentration) • No increase of micronuclei incidence, • ↑ chromosome gain/ loss/ mis-segregation with unclear concentration-dependence due to the large dose-spacing. Inconclusive.	Mužinić <i>et al.</i> , 2019 (not evaluated in EU-DAR)

Gelet op de onvolkomenheden die in de verschillende gepubliceerde studies worden aangehaald, lijkt de bewijsvoering of 'weight of evidence' voor duidelijke genotoxiciteit niet erg robuust. Voorts worden de meeste, maar niet alle eindpunten, zoals UDS- en komeettesten, vaak aangemerkt als enkel *indicaties* van mogelijke genotoxiciteit, maar minder van een duidelijk primaire interactie met het genetisch materiaal. Ook dient er opgemerkt dat de lange-termijnstudies van chloorpyrifos niet duiden op een carcinogeen vermogen, wat geen absoluut maar wel ondersteunende aanwijzing is van het gebrek aan sterk mutageen vermogen van deze stof.

Op basis van de voorliggende studies kan men moeilijk staande houden dat er een overtuigend bewijs is voor een specifiek mutageen effect van chloorpyrifos, niettegenstaande een bepaalde residuele onzekerheid, zoals overigens vertaald in de EFSA conclusie ("*...all the experts agreed that these uncertainties should be considered in the risk assessment.*") (EFSA, 2019c).

Vanuit kwantitatief oogpunt is het erg moeilijk een NOAEL/LOAEL vast te stellen, gelet op de dispariteit van de resultaten. Er zou kunnen voorgesteld worden dat de meest relevante "LOAEL" voor genotoxiciteit vastgesteld wordt op 0,5 mg/kg lg per dag, hoewel het hier gaat om een studie waar clastogeniteit werd vastgesteld (Abdelaziz *et al.*, 2010), wat in tegenstelling is tot indirecte genotoxische eindpunten zoals aneugenie of algemene DNA-schade, en over het algemeen niet beschouwd kan worden als een drempel-effect. De waarde gevonden in Kopjar *et al.* (2018) is lager, maar gelet op de bijzonder lage spatiëring van de dosissen niet zo betrouwbaar.

In breder perspectief echter mag redelijkerwijs verondersteld worden dat het meest kritisch (en op een meer robuuste manier aangetoond) eindpunt niet genotoxiciteit, maar neurotoxiciteit is. Daarom wordt voorgesteld om de LOAEL voor ontwikkelingsneurotoxiciteit als referentiepunt voor de gevaarkarakterisering van chloorpyrifos te beschouwen.

Referenties

- Abdelaziz, K.B., El Makawy, A.I., El-Abidin Abd Elsalam, A.Z., & Darwish, A.M. (2010). Genotoxicity of chlorpyrifos and the antimutagenic role of lettuce leaves in male mice. *Communicata Scientiae* 1, 137–145.
- Cui, Y., Guo, J., Xu, B., & Chen, Z. (2011). Genotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin to ICR mouse hepatocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21, 70–74.
- Kopjar, N., Žunecb, S., Mendaš, G., Micek, V., Kašuba, V., Mikolić, A., Lovaković, B.T., Milić, M., Pavičić, I., Čermak, A.M.M., Pizent, A., Vrdoljak, A.L., & Želježić, D. (2018). Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 279, 51–63.
- Mehta, A., Verma, R.S., & Srivastava, N. (2008). Chlorpyrifos-induced DNA damage in rat liver and the brain. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49, 426–433.
- Mužinić, V., Ramić, S., & Želježić, D. (2019). Chromosome missegregation and aneuploidy induction in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* by low concentrations of chlorpyrifos, imidacloprid and α -cypermethrin. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 60 (1), 72–84.
- Sandhu, M.A., Saeed, A.A., Khilji, M.S., Ahmed, A., Latif, M.S., & Khalid, N. (2013). Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos: a gender related approach in regular toxicity testing. *The Journal of Toxicological Sciences* 38, 237–244.