

Dibasische Ester

- Dimethylsuccinat (CAS-Nr. 106-65-0)
- Dimethylglutarat (CAS-Nr. 1119-40-0)
- Dimethyladipat (CAS-Nr. 627-93-0)

1 AGW (für das Gemisch und die einzelnen Ester)

8 mg/m³

1,2 ppm

Spitzenbegrenzung: Kategorie I,2

Schwangerschaftskategorie Y

2 Stoffcharakterisierung

Dibasische Ester

Die dibasischen Ester (DBE) stellen ein synthesebedingtes, definiertes Gemisch aus den folgenden Estern dar:

Dimethylsuccinat:	15 – 25 %
Dimethylglutarat:	55 – 67 %
Dimethyladipat:	10 – 25 %
Strukturformel:	H ₃ C-O-CO-(CH ₂) ₂₋₄ -CO-O-CH ₃
Molekulargewicht:	ca. 160 g/Mol
CAS-Nr.:	-
Schmelzpunkt:	ca. -20 °C
Siedepunkt:	196 - 225 °C
Wasserlöslichkeit:	5,3 g/ 100 g
Verteilungskoeffizient (log P _{OW}):	0,19 (berechnet)
Umrechnungsfaktoren:	1 ppm = ca. 6,6 mg/m ³ 1 mg/m ³ = ca. 0,15 ppm

Dimethylsuccinat

Summenformel:	C ₆ H ₁₀ O ₄
Strukturformel:	H ₃ C-O-CO-(CH ₂) ₂ -CO-O-CH ₃
Molekulargewicht:	146 g/Mol
CAS-Nr.:	106-65-0
Schmelzpunkt:	19 °C
Siedepunkt:	196 °C
Wasserlöslichkeit:	7,5 g/ 100 g
Verteilungskoeffizient (log P _{OW}):	0,19 (berechnet)
Umrechnungsfaktoren:	1 ppm = 6,1 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,17 ppm

Dimethylglutarat

Summenformel:	C7H12O4
Strukturformel:	H3C-O-CO-(CH2)3-CO-O-CH3
Molekulargewicht:	160 g/Mol
CAS-Nr.:	1111-40-0
Schmelzpunkt:	-37 °C
Siedepunkt:	214 °C
Wasserlöslichkeit:	4,3 g/ 100 g
Verteilungskoeffizient (log PO/W):	0,62 (berechnet)
Umrechnungsfaktoren:	1 ppm = 6,6 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,15 ppm

Dimethyladipat

Summenformel:	C8H14O4
Strukturformel:	H3C-O-CO-(CH2)4-CO-O-CH3
Molekulargewicht:	174 g/Mol
CAS-Nr.:	627-93-0
Schmelzpunkt:	8,5 °C
Siedepunkt:	231 °C
Wasserlöslichkeit:	2,4 g/ 100 g
Verteilungskoeffizient (log PO/W):	1,03 (berechnet)
Umrechnungsfaktoren:	1 ppm = 7,2 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,14 ppm

Verwendete Abkürzungen:

DBE: Dibasische Ester
DMA: Dimethyladipat
DMG: Dimethylglutarat
DMS: Dimethylsuccinat
MMA: Monomethyladipat
MMG: Monomethylglutarat
MMS: Monomethylsuccinat

Eine zusammenfassende Beschreibung der toxikologischen Studien und Humandaten findet sich in den IUCLID-Datensätzen der einzelnen Ester (EC-ECB, 2000), Montelius (1999) und insbesondere in EPA (2002) und Hartwig (2006). Die folgende Darstellung konzentriert sich auf die für die Ableitung eines Luftgrenzwertes zentralen Studien mit wiederholter Belastung und die Studien zu den CMR-Endpunkten.

3 Toxikokinetik/Metabolismus

Deposition in der Rattennase

Morris et al. (1991) isolierten chirurgisch den oberen Atemtrakt von Ratten, um die Deposition einzelner DBE und des DBE-Gemisches in einem unidirektionalen Flussmodell zu untersuchen. Die einzelnen DBE zeigten hohe Depositionsraten in der Nase von mehr als 98%. Fast identische Depositionsraten (ca. 97%) wurden beobachtet, wenn die Ratten gegen ein Gemisch der Ester exponiert wurden.

Enzymkinetik des DBE-Metabolismus und Untersuchungen zur Zytotoxizität der Metaboliten in Mitochondrien der Rattenleber

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der DBE mit Intermediaten des Krebszyklus untersuchten Bogdanffy und Londergan (1989) an Mitochondrien aus Rattenhepatozyten, ob die einzelnen Ester in vitro einen Einfluss auf die ATP-Synthese haben. Bei einer Konzentration von 100 μM zeigte sich eine Hemmung der ATP-Synthese um 11% bis 27%. Die Wirkungsstärke nahm mit abnehmender Kettenlänge ab (DMA > DMG > DMS). Für die V_{max}/k_m -Werte der Hydrolyse zu den Monomethylestern ergab sich die gleiche Reihenfolge. Die Vorbehandlung der Ratten (dreimal täglich) mit 100 mg/kg Bis(p-Nitrophenyl)phosphat, einem Esteraseinhibitor, reduzierte die Hydrolyserate um ca. 50% und schützte die Mitochondrien vor einer durch DBE verursachten Hemmung der ATP-Synthese. Die Studie, die nur als Abstract veröffentlicht wurde, liefert erste Hinweise, dass die Toxizität durch die Säuren nach Esterasespaltung vermittelt wird.

Enzymkinetik des DBE-Metabolismus und Untersuchungen zur Zytotoxizität in Homogenaten des olfaktorischen und respiratorischen Epithels der Rattennase

Patterson et al. (1988) bestimmten in Gewebehomogenaten des Nasenepithels von Ratten die kinetischen Konstanten der Esterhydrolyse der verschiedenen DBE. Die V_{max} -Werte für die Bildung von Monomethylsuccinat (MMS), Monomethylglutarat (MMG) und Monomethyladipat (MMA) waren im olfaktorischen Epithel ca. 8- bis 10-mal größer als im respiratorischen Epithel. Die V_{max}/k_m -Werte für die Bildung von MMG und MMA waren im olfaktorischen Epithel ebenfalls ca. 9- und 10-mal größer als im respiratorischen Epithel. Der V_{max}/k_m -Wert für die MMS-Bildung war allerdings im respiratorischen Epithel ca. 2-fach höher als im olfaktorischen Epithel. Die V_{max}/k_m -Werte verdeutlichen, dass die Spaltung zumindest bei DMA und DMG unter den gewählten Versuchsbedingungen im olfaktorischen Epithel stärker ausgeprägt ist. Die freien Dicarbonsäuren konnten nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden als Abstract publiziert, ähnliche Untersuchungen sind ausführlicher in Bogdanffy et al. (1991) beschrieben.

Bogdanffy et al. (1991) bestimmten in vitro in homogenisiertem olfaktorischem und respiratorischem Epithel der Rattennase enzymkinetische Parameter der Esterasespaltung von DMA, DMG und DMS (z. B. V_{max} , k_m und V_{max}/k_m). Unter den in vitro Versuchsbedingungen war die Bildung von Monomethylestern nachweisbar, freie Säuren wurden nicht gebildet. Die V_{max} -Werte für die dibasischen Ester, die den Umsatz bei Substratsättigung beschreiben, waren in beiden Geschlechtern im olfaktorischen Epithel 5- bis 13-fach höher als im respiratorischen Epithel. V_{max}/k_m -

Werte, die den Umsatz bei niedrigeren, eher praxisrelevanten Belastungen beschreiben, waren in beiden Geschlechtern im olfaktorischen Epithel 4- bis 11-fach höher (siehe Tabelle 1). Die k_m -Werte der einzelnen Ester waren im olfaktorischen und respiratorischen Epithel relativ ähnlich. Die Unterschiede in der Hydrolyseaktivität im olfaktorischen und respiratorischen Epithel basieren also insbesondere auf unterschiedlichen V_{max} -Werten. Die V_{max}/k_m -Werte der einzelnen Ester sinken in der Reihenfolge DMA > DMG > DMS. Der V_{max}/k_m -Wert war im olfaktorischen Epithel der beiden Geschlechter ähnlich, wenn DMG als Substrat gewählt wurde. Mit DMS als Substrat war er bei den weiblichen Tieren im Vergleich zu den männlichen Tieren etwa halbiert, mit DMA als Substrat knapp verdoppelt. Die Enzymaktivität konnte durch Vorbehandlung mit dem Esteraseinhibitor Bis(p-Nitrophenyl)phosphat gehemmt werden. Eine Hemmung der Enzymaktivität durch die Substrate konnte erst bei hohen Konzentrationen > 25 mM, die in vivo wahrscheinlich nicht erreicht werden, nachgewiesen werden. Die Versuchsergebnisse unterstützen die These, dass die Bildung von Säuren einen wesentliche Rolle im Mechanismus der Toxizität spielt. Die Daten zeigen außerdem, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen im olfaktorischen Epithel eine schnellere Toxifizierung stattfindet.

Enzymkinetik des DBE-Metabolismus in Homogenaten des olfaktorischen und respiratorischen Epithels der menschlichen Nase

In einem Abstract von Kee et al. (1989) werden weitere enzymkinetische Untersuchungen zur Hydrolyse von DMA, DMG und DMS in Homogenaten der Nasenschleimhaut von männlichen und weiblichen Ratten und ein Vergleich mit menschlichem Nasengewebe beschrieben. Die Ergebnisse der Versuche mit Rattengewebe sind ausführlicher in der oben beschriebenen Arbeit von Bogdanffy et al. (1991) dargestellt, die Beschreibung der Untersuchungen mit Humangewebe ist sehr knapp. Etwas mehr Informationen können einem Übersichtsartikel (Bogdanffy und Frame (1994)) entnommen werden. Gewebeproben des respiratorischen und olfaktorischen Epithels wurden Autopsiefällen entnommen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Personen waren zwischen 15 und 55 Jahre alt, das Geschlecht wird nicht angegeben. Zwischen Eintritt des Todes und der Autopsie (postmortem interval) vergingen 3 bis 7 Stunden. 3 Proben der beiden Schleimhauttypen wurden aus ca. 50 Autopsien anhand einer histopathologischen Begutachtung ausgewählt. Die ausgewählten Gewebe waren histologisch normal und zumindest mäßig gut erhalten. In Tabelle 2 sind die V_{max} -Werte der Enzymaktivitäten aus Ratten- und Humangewebe vergleichend dargestellt. In den Homogenaten aus Humangewebe wurde teilweise keine Aktivität nachgewiesen. Die messbaren Aktivitäten der menschlichen Gewebeproben waren 2 bis 3 Größenordnungen niedriger als die der Ratte. Die Werte deuten eine höhere Enzymaktivität im Rattengewebe unter den gewählten in vitro-Bedingungen an. Die Befunde sind allerdings unsicher, da Methodik und Ergebnisse nur knapp beschrieben sind. Außerdem bestehen Unsicherheiten bezüglich der Qualität des Humangewebes, der geringen Probenzahl und der Eignung von Studien mit Gewebehomogenaten.

Enzymkinetik des DBE-Metabolismus und Untersuchungen zur Zytotoxizität in olfaktorischem und respiratorischem Epithel in chirurgisch explantiertem Nasengewebe der Ratte

Trela und Bogdanffy (1990, 1991a) untersuchten den Metabolismus und die Zytotoxizität der einzelnen DBE in explantiertem Nasengewebe, das die Zell- und Gewebestruktur des Epithels besser erhält als Homogenate. Die Explantate der olfaktorischen und respiratorischen Region von weiblichen Ratten wurden für 2 h 10–100 mM DMA, DMG oder DMS ausgesetzt und die Freisetzung von saurer Phosphatase, einem biochemischen Marker für Zytotoxizität und die von verschiedenen Metaboliten gemessen. Die einzelnen DBE verursachten einen dosisabhängigen Anstieg von saurer Phosphatase und gleichzeitig einen Anstieg der Monomethylester. Freie Dicarbonsäuren wurden auch gebildet, es zeigte sich jedoch keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit. Die Konzentrationen der Metaboliten und der Phosphatase waren in den Studien mit olfaktorischer Mucosa höher als in denen mit respiratorischer Mucosa. Die Zytotoxizität und die Freisetzung von Säuren war deutlich reduziert, wenn die Ratten vorher Bis(p-nitrophenyl)phosphat, einen Inhibitor der Carboxylesterase, erhielten. Enzymkinetische Konstanten (z. B. V_{max}/k_m) wurden nicht bestimmt. Eine unterschiedlich effektive Spaltung der einzelnen DBE wird nicht beschrieben. Anhand der Studie konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Toxizität durch die Metaboliten nach enzymatischer Aktivierung verursacht wurde.

Trela und Bogdanffy (1991b) bzw. Retallak et al. (1991) untersuchten in explantiertem Nasengewebe von weiblichen Ratten Metabolismus und Zytotoxizität der Monomethylmetabolite der einzelnen DBE bei Konzentrationen von 10 bis 50 mM. Monomethyladipat (MMA), Monomethylglutarat (MMG) und Monomethylsuccinat (MMS) führten insbesondere bei 50 mM zur Freisetzung von saurer Phosphatase, einem Indikator für Zytotoxizität. Die zytotoxische Potenz folgte der Reihe MMA > MMG > MMS. Die zytotoxische Reaktion wurde bei MMA und MMG von der Bildung von freien Dicarbonsäuren begleitet. Die Bildung von Bernsteinsäure (succinic acid) aus MMS war sehr gering. Bis(p-Nitrophenyl)phosphat hemmte sowohl die Hydrolyse als auch die Zytotoxizität. Der Zusatz der freien Dicarbonsäuren Adipinsäure, Glutarsäure und Bernsteinsäure führte zu einer konzentrationsabhängigen Zytotoxizität, die Säuren wurden durch das explantierte Nasengewebe jedoch nicht metabolisiert. Bis(p-Nitrophenyl)phosphat zeigte keine Auswirkungen auf die Zytotoxizität der freien Säuren. Die Studie belegt, dass die Monomethylester und die freien Säuren eine zytotoxische Wirkung auf das Nasengewebe ausüben.

Immunhistochemischer Nachweis der Esterase im Nasengewebe der Ratte

Olsen et al. (1993) versuchten die Carboxylesterase in Nasengewebe der Ratte mit immunhistochemischen Methoden nachzuweisen. Als Detektionsmittel wurde ein Kaninchenantiserum gegen eine 59 KD Carboxylesterase aus Rattenlebermikrosomen eingesetzt. Das Antiserum zeigte die deutlichste Reaktion in der olfaktorischen Mucosa. Ein Nachweis von Carboxylesterase gelang in Zellen der Bowmanschen Drüsen und in Stützzellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft der neuronalen Zellen liegen. In den sensorischen Neuronen, die auch Zielzellen der Toxizität sind, wurde eine Carboxylesterase nicht nachgewiesen. Respiratorisches Epithel und Plattenepithel zeigten geringere Carboxylesterasegehalte.

Review zum Mechanismus der nasalen Toxizität

In einer Übersichtssarbeit diskutieren Bogdanffy und Frame (1994) die Toxizität der einzelnen dibasischen Ester im olfaktorischen Epithel und insbesondere die Untersuchungen zum Mechanismus. Die beschriebenen enzymkinetischen Untersuchungen wiesen in verschiedenen in vitro-Ansätzen im olfaktorischen Epithel eine höhere Esteraseaktivität als im respiratorischen Epithel nach. Die Befunde wurden durch immunhistochemische Untersuchungen gestützt. Innerhalb des olfaktorischen Epithels waren insbesondere die Stützzellen, die die neuronalen Zellen versorgen, und die Zellen der Bowmanschen Drüsen intensiv markiert worden. Die enzymatische Hydrolyse führte zur Bildung der entsprechenden Monomethylester und der freien Dicarbonsäuren. Zytotoxische Wirkungen gingen nicht von den einzelnen DBE aus, sondern wurden durch die Spaltprodukte vermittelt. Wahrscheinlich ist die Absenkung des pH-Wertes durch die Bildung von Carbonsäuren verantwortlich für die zytotoxische Wirkung der DBE. Humanes Zellhomogenat des olfaktorischen und respiratorischen Epithels, das im Rahmen von Autopsien erhalten wurde, wies eine um Größenordnungen niedrigere enzymatische Aktivität auf. Die Autoren leiten aus den Untersuchungen ab, dass Menschen im Vergleich zur Ratte einem deutlich reduzierten Risiko ausgesetzt sind.

Bewertung der durchgeführten Untersuchungen

In umfangreichen Untersuchungen wurden der Metabolismus und der Mechanismus der Toxizität der einzelnen DBE im Nasengewebe untersucht. Die Ergebnisse der Studien zur Enzymkinetik und zur Zytotoxizität lassen den Schluss zu, dass die im Tierexperiment nachgewiesene Toxizität im olfaktorischen Epithel wahrscheinlich durch die pH-Absenkung nach Esterhydrolyse verursacht wird. Die weiteren Metabolismusschritte, die die Dicarbonsäuren nach Deacetylierung in den Intermediärstoffwechsel überführen, waren im Nasengewebe nicht nachweisbar. Eventuell waren die verwendeten in vitro-Systeme nicht geeignet, die komplexeren und energieaufwendigen Reaktionen, die beispielsweise über eine Aktivierung mit AcetylCoA in den Intermediärstoffwechsel überleiten, zu ermöglichen.

Besondere Bedeutung für die Interspeziesextrapolation haben die Untersuchungen, die die enzymatischen Konstanten der Esteraseaktivität in der Ratte mit denen aus Zellhomogenaten des humanen Nasenepithels verglichen. Da jedoch Defizite in der Methodik und der Beschreibung der Ergebnisse vorliegen, wird die Relevanz der knapp beschriebenen Informationen in Frage gestellt. Spätere Bestimmungen der Esteraseaktivitäten mit Vinylacetat konnten in Zellhomogenaten aus humanem Nasengewebe zunächst ebenfalls keine Esteraseaktivität messen (Bogdanffy et al. 1999, Andersen et al. 2002, Bogdanffy et al. 1998), konnten diese aber in einem weiter entwickelten Versuchsansatz, der die Gewebestruktur besser erhält, nachweisen. Die enzymkinetischen Konstanten in Ratte und Mensch erwiesen sich als ähnlich. Dieser Vergleich mit Vinylacetat relativiert zusätzlich die Eignung der Homogenatuntersuchungen. Mit Methylmethacrylat als Substrat wurde mit einer mikrosomalen Fraktion des olfaktorischen Epithels von Ratte und Mensch allerdings eine ca. 13-fach höhere V_{max} in der Ratte gemessen (Mainwaring et al. 2000).

Eine Zusammenführung der einzelnen Studienergebnisse zu den DBE in einem PBPK-Modell, das alle einzelnen Parameter berücksichtigt, wurde nicht vorgenommen. Die entsprechenden Modelle zu Vinylacetat und Methylmethacrylat

(Bogdanffy et al. 1999, Andersen und Sarangapani 2001) haben verdeutlicht, dass die selektive Berücksichtigung einzelner in vitro-Ergebnisse der komplexen Verkettung vieler Einflussgrößen in vivo nicht gerecht wird. Aus diesen Gründen werden die Unterschiede in der Esteraseaktivität in Homogenaten des Zielgewebes von Ratte und Mensch, die zudem in der Methodik und der Beschreibung der Ergebnisse Mängel aufweisen, bei der Interspeziesextrapolation nicht berücksichtigt (s. u.).

4 Akute Toxizität

Es liegen keine für die Ableitung des Grenzwertes relevanten Informationen vor. Weitere Informationen sind in den oben genannten Reviews enthalten.

5 Reizwirkung/Ätzwirkung

Es liegen keine für die Ableitung des Grenzwertes relevanten Informationen vor. Weitere Informationen sind in den oben genannten Reviews enthalten.

6 Sensibilisierung

Es liegen keine für die Ableitung des Grenzwertes relevanten Informationen vor. Weitere Informationen sind in den oben genannten Reviews enthalten.

7 Toxizität nach wiederholter Belastung

Erfahrungen am Menschen

Berichte zur Exposition des Menschen nach wiederholter inhalativer Exposition liegen nicht vor.

Tierexperimentelle Daten

Studien mit dem DBE-Gemisch

In einer 14-Wochen-Studie (5 d/w, 6 h/d) wurden Crl:CD/BR Ratten (10 ♀/10 ♂) gegen 0, 160, 400 und 1000 mg/m³ DBE¹ exponiert (Dupont Co 1986, Kelly et al. 1986). Die Tiere wurden einer ausführlichen klinischen, pathologischen und histopathologischen Untersuchung unterzogen. In der obersten Dosis wurde ein nasses Fell aufgrund der Deposition des Aerosols, ein reduzierter Körpergewichtszuwachs und geringfügig erniedrigte Natriumspiegel im Serum beobachtet. In der mittleren und obersten Dosis zeigte sich ein geringer Anstieg des Calciumspiegels im Serum weiblicher Ratten. Ein dosisabhängig erniedrigtes

¹ Dimethylsuccinat (CAS-Nr. 106-65-0) : 16,9 %
Dimethylglutarat (CAS-Nr. 1111-40-0) : 66,6 %
Dimethyladipat (CAS-Nr. 627-93-0) : 16,5 %

absolutes und relatives Lebergewicht wurde in allen DBE-exponierten weiblichen Tieren und in den männlichen Tieren der obersten Dosis nachgewiesen. In der obersten Dosis wurde außerdem ein geringer Anstieg des relativen Herz- und Hodengewichts in Männchen und ein geringe Senkung der Milzgewichts in Weibchen beobachtet. Die histopathologische Untersuchung zeigte Plattenepithelmetaplasien primär im olfaktorischen Epithel in allen Dosisgruppen (siehe Tabelle 3). Die Wirkungen waren in der niedrigsten Dosis minimal (3 von 20 Tiere), in den beiden höheren Dosierungen minimal bis leicht ausgeprägt. Eine weibliche Ratte der mittleren Dosis zeigte den Effekt in mäßiger Ausprägung. Bei einigen Tieren, insbesondere in der mittleren und oberen Dosis, wurden die Metaplasien von einer suppurativen Entzündung begleitet. Weitere histopathologische Veränderungen wurden nicht beobachtet. Auf der Basis der Wirkungen im olfaktorischen Epithel wurde ein LOEL von 160 mg/m^3 ermittelt, ein NOEL wurde nicht bestimmt. Die leichten Veränderungen der klinischen Chemie und Organgewichte, die nicht von histopathologischen Wirkungen begleitet werden, sind von minimaler biologischer Signifikanz. In einer parallel durchgeführten Inhalationsstudie zur Reproduktionstoxizität wurden je 20 Tiere pro Geschlecht nach einer 14-wöchigen Vorexposition während der Verpaarung, Schwangerschaft und Laktation circa weitere 8 Wochen (meist 7 d/w) exponiert (Details siehe unter Reproduktionstoxizität, Dupont 1987b). Das Nasengewebe wurde ebenfalls histopathologisch untersucht. Die oben beschriebenen Wirkungen wurden ebenfalls beobachtet und traten mit etwas höherer Inzidenz und stärkerer Ausprägung auf (siehe Tabelle 4).

DBE² wurden in einer inhalativen 7- bzw. 13-Wochenstudie (5 d/w, 6 h/d) in Konzentrationen von 0, 20, 76 und 390 mg/m^3 an CrI:CD/BR-Ratten (40 ♀/40 ♂) verabreicht (Keenan et al. 1990, Dupont 1987f). Je 10 Ratten pro Geschlecht wurden nach 7 Wochen und je 20 Ratten pro Geschlecht nach 13 Wochen getötet, je 10 weitere Ratten pro Geschlecht durchliefen nach 13 Wochen Exposition eine Erholungsphase von 6 Wochen. Eine Ratte der mittleren Dosierung wurde in extremis getötet („urinary obstruction“), eine weitere Ratte der mittleren Dosierung wurde irrtümlich getötet. Die Ratten der obersten Dosisgruppe zeigten ein reduzierten Körpergewichtszuwachs (<6 %). Klinische Anzeichen wurden nicht beobachtet. Vereinzelt wurden statistisch signifikante Veränderungen der klinischen Chemie, Hämatologie und Urinanalyse beobachtet, die generell im Bereich der biologischen Variation waren und nicht als stoffbedingt betrachtet wurden. Die weiblichen Ratten der höchsten (390 mg/m^3) Dosis zeigten nach 7 bzw. 13 Wochen ein erniedrigtes absolutes Lebergewicht (9,2 % bzw. 15,5 %), das nach Ende der Erholungsphase nicht mehr nachweisbar war. Die histopathologische Untersuchung beschränkte sich auf die Nase. Nach 7 Wochen zeigten sich im olfaktorischen Epithel der Nasenhöhle minimale bis leichte Degenerationen (siehe Tabelle 5). Die Degenerationen zeigten sich u. a. als Nekrose, einem Verlust von sensorischen Zellen und Stützzellen („sustentacular cells“), Anzeichen einer Plattenepithelmetaplasie, einer Verdickung des Epithels und Exfoliationen. Die Wirkungen wurden bei der mittleren (76 mg/m^3) und der höchsten (390 mg/m^3) Dosis beobachtet. In der untersten Dosis zeigte sich eine minimale Degeneration nur bei einem männlichen Tier. Es ergibt sich ein NOEL von 20 mg/m^3 für beide

2	Dimethylsuccinat (CAS-Nr. 106-65-0)	:	16,9 %
	Dimethylglutarat (CAS-Nr. 1111-40-0)	:	66,6 %
	Dimethyladipat (CAS-Nr. 627-93-0)	:	16,5 %

Geschlechter. Nach 13 Wochen zeigten sich minimale bis mäßige Degenerationen des olfaktorischen Epithels bei den Weibchen bei allen Konzentrationen (Tabelle 6). Eine erneute Auswertung der histopathologischen Schnitte im Rahmen eines „Pathology Peer Review“ (EPL 2009) zeigte allerdings auch bei den weiblichen Kontrolltieren eine erhöhte Rate von Tieren mit Degenerationen des olfaktorischen Epithels (Kontrolle: 3/20, 20 mg/m³: 6/20, 76 mg/m³: 8/19, 390 mg/m³: 19/20). Eines der 3 betroffenen Kontrolltiere zeigte 2 verschiedene Veränderungen im olfaktorischen Epithel. Aufgrund der erhöhten Rate in der Kontrolle, kann die unterste Dosis auch für Weibchen als NOEL gewertet werden. Die Männchen der mittleren und hohen Dosis zeigten minimale bis mäßige Degenerationen, 20 mg/m³ erwiesen sich als NOEL für männliche Tiere. Wurde an die 13-wöchige Exposition eine 6-wöchige Erholungsphase angeschlossen, zeigte sich noch eine Disorganisation, eine respiratorische Metaplasie und eine Vakuolisierung/Reduzierung der neuronalen Zellen im olfaktorischen Epithel (Tabelle 7). Für die männlichen Tiere kann ein NOEL von 20 mg/m³ abgeleitet werden, da nur 1 Tier mit einer minimalen respiratorischen Metaplasie reagierte. Bei den weiblichen Tieren deutet sich in der Nachbeobachtungsgruppe jedoch bezüglich der Zahl der Tiere mit Veränderungen im olfaktorischen Epithel ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der untersten Dosierung an (Kontrolle: 0/10, 20 mg/m³: 3/10, 76 mg/m³: 5/10, 390 mg/m³: 10/10), sodass sich für die 7-Wochen-Studien und die 13-Wochen-Studie, jedoch nicht für die Teilstudie mit Nachbeobachtung ein NOEL identifizieren lässt (siehe Tabelle 7b).

Insbesondere in der 13-Wochen-Studie wurde in allen Dosierungen und in den Kontrolltieren eine minimale bis mäßige Plattenepithelmetaplasie im respiratorischen Epithel ohne erkennbare Dosis-Wirkungsbeziehung beobachtet, deren Pathogenese unklar ist. Außerdem zeigte sich in allen Dosierungen und in den Kontrolltieren aller Teilstudien eine minimale bis mäßige Hyperplasie des submukosalen lymphoidalen Gewebes ohne erkennbare Dosis-Wirkungsbeziehung, deren Entstehung ebenfalls nicht klar ist. Diese unspezifischen Befunde unklarer Herkunft und die variablen Kontrollinzidenzen stellen die Eignung der Studie minimale Wirkungen sicher zu identifizieren in Frage.

Studien mit den einzelnen Estern DMA, DMG und DMS:

DMG wurde in einer inhalativen 90-Tage-Studie (5 d/w, 6 h/d) in Konzentrationen von 0, 10, 49 und 410 mg/m³ an CrI:CD(SD)IGS BR-Ratten (36 ♀/36 ♂) verabreicht (Dupont 2000). Außerdem wurde DMS in einer einzelnen Dosis von 400 mg/m³ und DMA in einer einzelnen Dosis von 390 mg/m³ verabreicht. Je 10 Tiere pro Geschlecht wurden nach 90 Tagen untersucht, je 10 Tiere pro Geschlecht durchliefen nach der 90-tägigen Exposition eine Erholungsphase von einem Monat. Zusätzlich zu den üblichen Prüfparametern wurde die Zellproliferation (u. a. im Nasengewebe), Neuroverhaltensänderungen („functional observational battery“, motorische Aktivität), Spermienparameter, Hormonspiegel im Serum und ophthalmologische Veränderungen überprüft. Die männlichen Ratten, die gegen 410 mg/m³ DMG und 390 mg/m³ DMA exponiert waren, zeigten geringere Körpergewichtszuwächse. Die Ratten der obersten DMG-Gruppe zeigten außerdem einen geringeren Futterverbrauch, die der obersten DMA-Gruppe eine geringere Futterverwertung. Als stoffbedingte histopathologische Wirkungen wurden bei den Tieren, die gegen 410 mg/m³ (62 ppm) DMG, 400 mg/m³ (66 ppm) DMS und 390

mg/m³ (54 ppm) DMA exponiert waren, Degenerationen/Atrophien des olfaktorischen Epithels beobachtet. Zusätzlich trat seltener eine fokale respiratorische Metaplasie im olfaktorischen Epithel auf. In der Gruppe, die eine Erholungsphase durchlief, wurden noch minimale, fokale Wirkungen beobachtet. Die Wirkungen waren bei allen Estern bis auf ein einzelnes Tier der DMA-Gruppe minimal bis leicht ausgeprägt. Die Inzidenzen zeigten gewisse Unterschiede, aber insgesamt zeigen die Ester ein ähnliches Wirkprofil (siehe Tabelle 8 und 9).

Die männlichen Tiere, die gegen DMS und DMA exponiert waren, wiesen nach 14 Tagen eine erhöhte Zellproliferation in der Leber auf, die nach 90 Tagen nicht mehr nachweisbar war. Die weiblichen Tiere der DMA-Gruppe zeigten eine erhöhte Zellproliferation in der Lunge nach 14 und 90 Tagen. Die DMG-exponierten Tiere zeigten nach 90 Tagen außerdem eine erhöhte Zellproliferation im Nasengewebe, die weiblichen Tiere auch nach 14 Tagen. Die männlichen DMA-exponierten Tiere und die weiblichen DMS-exponierten Tiere wiesen nach 90 Tagen ebenfalls eine erhöhte Zellproliferation in der Nase auf.

Bei den männlichen DMG-exponierten Ratten der mittleren und oberen Dosis war der Serumtestosterongehalt statistisch signifikant erniedrigt ($1,3 \pm 0,4$ ng/ml bzw. $1,1 \pm 0,4$ ng/ml; Kontrollwert: $2,2 \pm 0,9$ ng/ml, siehe Tabelle 10). Die Einzelwerte der mittleren Dosis reichten von 0,765 bis 1,842 ng/ml, die der oberen von 0,421 bis 1,712 ng/ml, die Kontrollwerte bewegten sich zwischen 1,085 und 4,044 ng/ml. Die Serum LH-Konzentration war ebenfalls dosisabhängig erniedrigt, zeigte aber eine statistische Signifikanz nur in der oberen Dosis ($1,2 \pm 0,2$ ng/ml, Kontrollwert: $1,7 \pm 0,4$ ng/ml). Die Werte der oberen Dosis bewegten sich zwischen 0,86 und 1,559 ng/ml, die der Kontrollgruppe reichten von 0,887 bis 2,174 ng/ml. Die FSH-Konzentration im Serum war nicht verändert. Bei den weiblichen Tieren der DMS-Gruppe wurde eine Reduzierung des Serumöstradiolspiegels ($21,8 \pm 26,9$ pg/ml; Kontrolle: $50,6 \pm 31,8$ pg/ml) beobachtet (siehe Tabelle 11). Die Progesteronwerte und der Östruszyklus waren nicht verändert.

Die Zahl der Spermien im Nebenhodenschwanz war in der mittleren ($435,4 \pm 51,2$ Mio) und oberen ($421,9 \pm 62,63$ Mio) DMG-Dosisgruppe erhöht (Kontrolle: $332,7 \pm 80,53$ Mio, siehe Tabelle 12). In der unteren Dosis waren die Werte im Kontrollbereich ($299,2 \pm 112,22$ Mio). Die Werte streuten in der Kontrolle von 270,1 bis 519,1 Mio, in der untersten Dosis von 0 bis 394,0 Mio (bei einem Tier konnten keine Spermien nachgewiesen werden), in der mittleren Dosis von 329,7 bis 519,1 Mio und in der obersten Dosis von 339,0 bis 502,7 Mio. In der DMS-Gruppe war der Wert ebenfalls erhöht ($509,2 \pm 121,80$ Mio, Kontrolle: $332,7 \pm 80,53$ Mio). Die Werte streuten in der Kontrolle von 270,1 bis 519,1 Mio und in der dosierten Gruppe von 415,0 bis 807,8 Mio. Ähnlich signifikante Veränderungen resultierten, wenn die Zahl der Spermien pro g Nebenhodenschwanz angegeben wurde. Motilität und Morphologie der Spermien und die Zahl der Spermatiden im Hoden zeigten keine Veränderungen. Gewichte und Histopathologie der Gonaden waren normal. Hormonspiegel im Serum und Spermienparameter wurden in den oben beschriebenen Studien mit dem DBE-Gemisch nicht erhoben.

Für DMG ergibt sich für die männlichen Tiere ein NOEL von 10 mg/m³ und für die weiblichen Tiere ein NOEL von 49 mg/m³. Bezogen auf lokale Wirkungen zeigte sich in beiden Geschlechtern ein NOEL von 49 mg/m³. Für DMS und DMA wurde kein NOEL bestimmt. Der Schweregrad der Schäden im Nasenepithel war bei den einzelnen Estern sehr ähnlich. Insgesamt kann aufgrund des ähnlichen

Schweregrades unter der Annahme einer ähnlich steilen Dosis-Wirkungs-Beziehung auch für DMA und DMS bei ca. 50 mg/m³ ein NEL für lokale Wirkungen erwartet werden. Die Schnitte der Studie von Dupont (2000) wurde ebenfalls im Rahmen eines „Pathology Peer Review“ einer erneuten Auswertung unterzogen (EPL 2009). Die erneute Auswertung bestätigt die wesentlichen Ergebnisse der Studie von Dupont (2000).

8 Fertilitätsminderung

Studien mit dem DBE-Gemisch

In einer inhalativen Studie zur Reproduktionstoxizität, die parallel zur Studie von Dupont Co 1986/Kelly et al. 1986 durchgeführt wurde, wurden CrI:CD/BR Ratten (20 ♀/20 ♂) nach einer 14-wöchigen Exposition (5 d/w, 6 h/d) gegen 0, 160, 400 und 1000 mg/m³ DBE³ miteinander verpaart (Dupont Co 1987b). Die Dosis von 1000 mg/m³ lag als Aerosol/Dampfmischung vor. Die Exposition wurde während der Verpaarung (15 Tage), Schwangerschaft (21 Tage) und der Laktationsphase (21 Tage) weitergeführt (meist 7 d/w). Die Exposition wurde am 19. Tag der Schwangerschaft unterbrochen und am 4. Tag postpartum wieder aufgenommen. Die Nachkommen wurden nicht exponiert. Der einzige expositionsbedingte Effekt bei den Nachkommen war ein reduziertes Körpergewicht bei 1000 mg/m³ von Tag 1 bis Tag 21 postpartum. Die Körpergewichte der männlichen Nachkommen waren bei 0, 160, 400 und 1000 mg/m³ DBE 45,0, 43,2, 41,3, und 40,0 g und bei den weiblichen Nachkommen 42,9, 41,4, 40,1 und 38,4 g. Expositionsbedingte Veränderungen des männlichen und weiblichen Fertilitätsindex, des Index der Lebendgeborenen, des Viabilitätsindex, des Schwangerschaftsindex und des Laktationsindex wurden nicht beobachtet. Eine makroskopische Untersuchung der 21 Tage alten Nachkommen zeigte keine stoffbedingten Wirkungen. Die histopathologische Untersuchung des Nasengewebes der Elterntiere wies eine Plattenepithelmetaplasie im olfaktorischen Epithel in allen dosierten Gruppen nach (Tabelle 4). Der Schweregrad war bei 160 mg/m³ hauptsächlich minimal, bei 400 und 1000 mg/m³ leicht bis mäßig ausgeprägt. Weitere histopathologische Veränderungen wurden nicht beobachtet. Zusätzlich wurde ein dosisabhängig erniedrigtes relatives Lebergewicht bei 400 und 1000 mg/m³, ein gering erhöhtes relatives Lungengewicht und ein gering erniedrigtes Körpergewicht bei 1000 mg/m³ beobachtet. Ein NOEL für die Plattenepithelmetaplasien wurde nicht ermittelt.

Die Reduktion der Körpergewichte der Nachkommen in der höchsten Dosis ist gering ausgeprägt und wird begleitet von einem reduzierten Körpergewicht der Elterntiere. Die Auswirkung wird nicht als spezifische reproduktionstoxische Wirkung bewertet.

Studien mit den einzelnen Estern DMA, DMG und DMS:

DMG verursachte in einer 90-Tage-Inhalationsstudie bei 49 und 410 mg/m³ eine Senkung des Testosteron- und bei 410 mg/m³ eine Senkung des LH-Spiegels im Serum männlicher Ratten (Beschreibung der Studie siehe vorne, Dupont 2000).

3	Dimethylsuccinat (CAS-Nr. 106-65-0)	:	17,8 %
	Dimethylglutarat (CAS-Nr. 1111-40-0)	:	65,1 %
	Dimethyladipat (CAS-Nr. 627-93-0)	:	16,8 %

Gleichzeitig war bei 49 und 410 mg/m³ die Zahl der Spermien im Nebenhoden erhöht. DMS führte in der einzigen geprüften Dosis von 400 mg/m³ ebenfalls zu einer Erhöhung der Spermienzahl im Nebenhoden, veränderte Testosteron- oder LH-Spiegel wurden nicht beobachtet. Historische Kontrolldaten zu den beschriebenen Effekten, die als Vergleich geeignet wären, lagen nicht vor. Veränderungen der Hoden- und Nebenhodengewichte oder histopathologische Veränderungen der männlichen Reproduktionsorgane wurden trotz Fixierung der Hoden und Nebenhoden nach Bouin nicht beobachtet. Die Zahl der testikulären Spermatozoen, die Spermienmotilität und -morphologie war unverändert. Die Spermatogenese wurde offensichtlich nicht gestört, trotzdem zeigte sich eine Anhäufung der Spermien im Nebenhoden. Möglicherweise waren funktionelle Parameter der Lagerung und des weiteren Transportes der Spermien verändert. Ein Zusammenhang der gesteigerten Zahl der Spermien im Nebenhoden mit den gesenkten Hormonspiegeln ist wenig wahrscheinlich, da nach Chapin und Conner (1998) das hormonelle Milieu einen geringen Einfluss auf die Spermienzahl des Nebenhodens hat. Ein Zusammenhang zwischen den beiden gegenläufigen Parametern wird durch die Ergebnisse zu DMS ebenfalls nicht bestätigt. DMS führte zu einer erhöhten Spermienzahl, zeigte aber keinen Einfluss auf die Hormonspiegel. Die biologische Signifikanz der gesenkten Serumspiegel von Testosteron und LH und der erhöhten Spermienzahlen ist unklar. Da sich in der Fertilitätsstudie mit DBE (siehe oben, Dupont Co 1987b) auch im hohen Dosisbereich keine wesentlichen Einflüsse auf die Fertilität zeigten, wird die Bedeutung der veränderten Hormonspiegel und Spermienzahlen weiter relativiert. Die Wirkungen werden nicht als adverser Effekt gewertet.

DMS verursachte in weiblichen Ratten in der einzigen geprüften Dosis eine Senkung des Östradiolspiegels. Aufgrund der natürlichen Variabilität des Östradiolspiegels und der fehlenden Konkordanz zu Parametern des Östruszyklus bleibt die biologische Signifikanz dieses isolierten Befundes unklar. Die Wirkung wird nicht als adverser Effekt gewertet.

Insgesamt lässt sich aus den Daten keine für die Grenzwertsetzung relevante fertilitätsmindernde Wirkung ableiten. Eine Einstufung zum Endpunkt Fertilitätsminderung ist nicht erforderlich.

9 Fruchtschädigung

Studien mit dem DBE-Gemisch

In einer inhalativen Teratogenitätsstudie (Tag 7-16 der Schwangerschaft, 6 h/d) wurden CrI:CD/BR Ratten (24 pro Dosis) gegen 0, 160, 400 und 1000 mg/m³ DBE⁴ exponiert (Dupont Co 1987a, Kelly et al. 1986). Der maternale Körpergewichtszuwachs war in der mittleren und oberen Dosis während der Expositionszeit signifikant reduziert. Die maternale Futteraufnahme war bei diesen Dosierungen ebenfalls reduziert. In der obersten Dosis wurde eine Färbung des Fells (periokular, perinasal, Kopf) bzw. ein nasses Fell beobachtet. Der letzte Befund war

4	Dimethylsuccinat (CAS-Nr. 106-65-0)	:	17,8 %
	Dimethylglutarat (CAS-Nr. 1111-40-0)	:	65,1 %
	Dimethyladipat (CAS-Nr. 627-93-0)	:	16,8 %

das Ergebnis der Deposition des Aerosols im Fell. Es wurden keine weiteren Anzeichen von Maternaltoxizität beobachtet. Wirkungen auf die Überlebensrate der Feten, das Fetalgewichts, die Wurfgröße oder die Implantationen wurden nicht nachgewiesen. Die Inzidenz der fetalen Fehlbildungen und Variationen zeigte keine expositionsbedingten Veränderungen. Da eine leichte Maternaltoxizität bei der mittleren Dosis beobachtet wurde und Fetalttoxizität auch in der obersten Dosis nicht beobachtet wurde, wird ein NOEL von 160 mg/m³ für die Muttertiere und ein NOEL von 1000 mg/m³ für die Nachkommen abgeleitet.

Studien mit den einzelnen Estern DMA, DMG und DMS

In einer inhalativen Studie zur Entwicklungstoxizität (6 h/d) wurde DMG in Konzentrationen von 0, 30, 100, 300 und 1000 mg/m³ an jeweils 22 schwangere Kaninchen (Hra:(NZW)SPF) vom Tag 7 bis Tag 28 der Schwangerschaft verabreicht (Dupont 2003). Bei 1000 mg/m³ verstarb ein Tier, ein weiteres wurde in extremis getötet. Die Überlebenden zeigten einen reduzierten Körpergewichtszuwachs, eine reduzierte Futteraufnahme, Ausfluss aus den Augen und ein nasses Fell. Bei 30 und 100 mg/m³ wurde keine Maternaltoxizität beobachtet. Eine Entwicklungstoxizität wurde bei keiner Dosis nachgewiesen. Für Maternaltoxizität wird ein NOEL von 100 mg/m³ und für Entwicklungstoxizität ein NOEL von 1000 mg/m³ abgeleitet.

Eine für die Grenzwertsetzung relevante fruchtschädigende Wirkung liegt nicht vor. Eine Einstufung zum Endpunkt Fruchtschädigung ist nicht erforderlich.

10 Mutagenität

Studien mit dem DBE-Gemisch

DBE⁵ erwies als nicht mutagen im Standard Ames-Test in den Stämmen TA 98, TA 100, TA 1535 und TA 1537 mit und ohne metabolische Aktivierung durch Rattenlebermikrosomen (Vlachos et al. 1988). Ames-Tests, die mit DBE⁶ in Suspensionsansätzen in den Stämmen TA 98, TA 100 mit maximal 8,53 mg DBE/Testansatz (1,7 mg/ml) durchgeführt wurden, verliefen ebenfalls negativ (Dupont Co. 1987c, Vlachos et al. 1988). Die Prüfung im Stamm TM677 („Microforward suspension assay“) verlief als Suspensionsansatz mit und ohne metabolische Aktivierung durch eine S-9-Fraktion der olfaktorische Mucosa von weiblichen Ratten ebenfalls negativ (Dupont Co. 1987c, Vlachos et al. 1988). Die Mucosa von weiblichen Ratten wurde ausgewählt, da sich die weibliche Tiere in der 90 d-Studie mit DBE als empfindlicher erwiesen, es wurden maximal 100 µg DBE/Testansatz (0,9 mg/ml) geprüft.

5	Dimethylsuccinat (CAS-Nr. 106-65-0)	:	17 %
	Dimethylglutarat (CAS-Nr. 1111-40-0)	:	67 %
	Dimethyladipat (CAS-Nr. 627-93-0)	:	16 %
6	Dimethylsuccinat (CAS-Nr. 106-65-0)	:	14,9 %
	Dimethylglutarat (CAS-Nr. 1111-40-0)	:	68,9 %
	Dimethyladipat (CAS-Nr. 627-93-0)	:	15,9 %

Chromosomenaberrationen wurden nach einer 3-stündigen in vitro Exposition von menschlichen Lymphozyten mit DBE⁷ ohne S-9 nicht beobachtet (Vlachos et al. 1988, Dupont Co. 1987d). Es wurden Konzentrationen bis 6,6 mg/ml geprüft. Zytotoxizität, die sich als verzögerter Zellzyklus und reduzierter Mitoseindex zeigte, wurde bei Belastungen $\geq 3,3$ mg/ml festgestellt. Wurden jedoch DBE-Konzentrationen von $\geq 3,3$ mg/ml in Gegenwart eines S-9-Mixes aus Rattenleber geprüft, waren die Chromosomenaberrationen in Lymphocyten von weiblichen Spendern signifikant und reproduzierbar erhöht in (20,6% abnormale Zellen bei 4,4 mg/ml; Kontrolle: 2,8% (Vlachos et al. (1988))), nicht jedoch in den Lymphocyten männlicher Spender. Unter den gewählten Versuchsbedingungen erwies sich DBE als klastogen. In Untersuchungen, die die oben beschriebenen Expositionsbedingungen nachstellten, zeigte sich, dass in Gegenwart des S9-Mixes ein saurer pH-Wert im Kulturmedium bei Konzentrationen von 3,3 und 4,4 mg/ml beobachtet wurde. Die Absenkung des pH-Wertes trat schnell nach dem Zusatz von DBE auf, der resultierende pH-Wert lag in dem Bereich, der als klastogen in Gegenwart eines aktivierenden Systems berichtet wurde (EPA 2002). Die Induktion von Chromosomenaberrationen zeigte auch in Gegenwart des aktivierenden Systems eine gewisse Variabilität, da sowohl negative als auch positive Ergebnisse erzielt wurden. Die Variabilität könnte damit zusammenhängen, dass teils bereits im zytotoxischen Bereich geprüft wurde (EPA 2002).

DBE wurde in einem inhalativen Mikronukleustest an Mäusen (4 ♀/4 ♂ pro Behandlungsgruppe) in Konzentrationen von 0, 5500, 11000 und 19000 mg/m³ Aerosol über 6 h „nose-only“ verabreicht (Vlachos et al. 1988, Dupont Co. 1987e). Knochenmarkausstriche wurden nach 24, 48 und 72 h nach Beginn der Exposition gemacht. 1000 polychromatische Erythrozyten des Knochenmarks wurden auf Mikrokerne untersucht. Es wurde eine signifikante Reduktion des Verhältnisses von jungen polychromatischen zu ausgereiften normochromatischen Erythrozyten bei den Weibchen der 11000- und 19000 mg/m³-Gruppe nach 24 h beobachtet. Ein statistisch signifikanter Anstieg an Mikronuklei wurde in keiner der Behandlungsgruppen gefunden.

Studien mit den einzelnen Estern DMA, DMG und DMS:

DMG wurde in einem Zellmutationstest (HPRT) in CHO-Zellen in vitro geprüft (Huntington Life Sciences Ltd (2001a). Die Untersuchungen wurden mit und ohne S9-Mix und bis in zytotoxische Konzentrationsbereiche durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Erhöhungen der Mutationsrate festgestellt.

In einem inhalativen Mikronukleustest wurden Fischer-344-Ratten zweimal 6 h Konzentrationen von 0, 500, 1000 und 2000 mg/m³ DMG ausgesetzt (Huntington Life Sciences Ltd 2001b). Die Knochenmarksausstriche wurden 24 h nach der letzten Exposition angefertigt. Es wurden keine statistisch signifikanten Häufungen von Mikronuklei in unreifen Erythrozyten und kein wesentliches Absinken des Anteils unreifer Erythrozyten beobachtet.

7	Dimethylsuccinat (CAS-Nr. 106-65-0)	:	14,9 %
	Dimethylglutarat (CAS-Nr. 1111-40-0)	:	68,9 %
	Dimethyladipat (CAS-Nr. 627-93-0)	:	15,9 %

Mit DMA wurde ein inhalativer Mikronukleustest in Fischer-344-Ratten durchgeführt (Huntington Life Sciences Ltd 2001c). Die Tiere wurden zweimal 6 h gegen Konzentrationen von 0, 500, 1000 und 2000 mg/m³ exponiert. Die Knochenmarksausstriche wurden 24 h nach der letzten Exposition angefertigt. Es wurden keine statistisch signifikanten Häufungen von Mikronuklei in unreifen Erythrozyten und kein wesentliches Absinken des Anteils unreifer Erythrozyten beobachtet.

Basierend auf diesen Ergebnissen wird ein für die Grenzwertsetzung relevantes mutagenes Potenzial in vivo nicht erwartet. Eine Einstufung zum Endpunkt Mutagenität ist für DBE und die einzelnen Ester nicht erforderlich.

11 Kanzerogenität

Karzinogenitätsstudien liegen nicht vor. Die Studien zur Mutagenität und Struktur-Wirkungsüberlegungen liefern keine Hinweise auf ein karzinogenes Potenzial. Eine für die Grenzwertsetzung relevante karzinogene Wirkung liegt nicht vor. Eine Einstufung zum Endpunkt Karzinogenität ist für DBE und die einzelnen Ester nicht erforderlich.

12 Sonstige Daten

Es liegen keine weiteren für die Ableitung des Grenzwertes relevanten Informationen vor.

13 Ableitung des Grenzwertes

In Tabelle 13 sind die NOEL- und LOEL-Werte der verschiedenen Inhalationsstudien mit wiederholter Verabreichung zusammenfasst. Die Studie von Keenan et al. 1990 (Dupont 1987f/EPL 2009) zeigte Mängel aufgrund von unspezifischen Wirkungen unklarer Herkunft und Unsicherheiten bei der Auswertung und Beurteilung der minimal ausgeprägten Wirkungen, so dass diese Studie nicht zur Grenzwertsetzung herangezogen wird.

Für DMG, den Hauptbestandteil in DBE, wurde in einer 90 Tage-Studie (Dupont 2000) ein NOEL von 10 mg/m³ nachgewiesen. Bei 49 und 410 mg/m³ wurden gesenkte Serumspiegel von Testosteron und LH und eine Erhöhung der Zahl der Spermien im Nebenhoden beobachtet. Da jedoch keine Auswirkungen auf Gewicht und Histopathologie der Gonaden, die Spermienreifung, die Motilität und Morphologie der Spermien und Parameter der Studien zur Reproduktions- und Entwicklungstoxizität gezeigt werden konnten, ist die biologische Signifikanz fraglich. Die Wirkungen werden nicht als adverse Effekte bewertet (siehe auch unter Reproduktionstoxizität). Ähnliches gilt für die Senkung des Östradiolspiegels nach Exposition gegen DMS. Minimal bis leicht ausgeprägte Degenerationen/Atrophien im olfaktorischen Epithel wurden bei 410 mg/m³ (62 ppm) DMG nachgewiesen. DMS und DMA, die nur in einer Konzentration von 400 mg/m³ (66 ppm) bzw. 390 mg/m³ (54 ppm) geprüft wurden, zeigten ein ähnliches Wirkungsbild, die Inzidenzen waren

jedoch teils unterschiedlich. Die einzelnen Ester sind in ihrer Wirkart fast identisch, die Unterschiede in der Wirkungsstärke sind in der Gesamtschau eher gering. Eine gemeinsame Bewertung der Ester als Stoffklasse ist angemessen. Ein NOEL für diese Wirkungen wurde für DMG bei 49 mg/m^3 festgestellt, der aufgrund des adversen Charakters auch als NOAEL gewertet wird. Für DMS und DMA ist ein NAEL aufgrund des ähnlichen Wirkungsbildes unter der Annahme eines ähnlich steilen Verlaufs der Dosis-Wirkungs-Beziehung ebenfalls bei ca. 50 mg/m^3 anzunehmen. Die Konzentration von 50 mg/m^3 wird als Startpunkt der Grenzwertableitung verwendet. Für die Grenzwertsetzung relevante CMR-Eigenschaften liegen nicht vor.

Bei der Interspeziesextrapolation werden die enzymkinetischen Untersuchungen, die mit Homogenaten des Nasenepithels von Ratte und Mensch durchgeführt wurden, nicht verwendet, da Mängel in der Methodik und Beschreibung der Ergebnisse vorliegen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass einzelne in vitro-Ergebnisse die komplexe Verkettung vieler Einflussgrößen in vivo nicht angemessen wiedergeben. Eine entsprechende Modellierung in einem PBPK-Modell liegt nicht vor. Für Vinylacetat, das als Ester nach einem ähnlichen Mechanismus toxifiziert wird und ebenfalls das olfaktorische Epithel schädigt, hat ein PBPK-Modell eine ähnliche Sensitivität von Ratte und Mensch ergeben (Andersen et al. 2002, Bogdanffy et al. 1999). Bei einer leicht bis mäßigen körperlichen Aktivität (Atemvolumen: $10 \text{ m}^3/8 \text{ h}$) wurde der Mensch als etwas empfindlicher berechnet. Das PBPK-Modell für Vinylacetat wurde bezüglich der Extraktion von Vinylacetat aus der Atemluft durch das Nasenepithel und der Freisetzung des Metaboliten Acetaldehyd durch eine Probandenstudie validiert (Hinderliter et al. 2005). Für Methylmethacrylat wurde in einem entsprechenden Modell eine 1,6- bis 8-fach höhere Empfindlichkeit der Ratte errechnet (Andersen und Sarangapani, 2001, Andersen et al. 1999). Die unmittelbare Übertragung dieser Ergebnisse auf andere Ester ist nicht ohne Weiteres angemessen, da sich Einflussgrößen wie Löslichkeit im Gewebe, Gewebediffusion und die kinetischen Konstanten deutlich unterscheiden können. Die bisherigen Modellierungen bei Estern deuten jedoch an, dass sich die Empfindlichkeitsunterschiede innerhalb der gleichen Größenordnung bewegen. Zusammenfassend erscheint es für die DBE angemessen, den Standardfaktor von 1 zu verwenden.

Die Zeitextrapolation wird mit einem Standard-Faktor von 1/2 durchgeführt.

Bei der Ableitung des abschließenden Faktors zur Intra- und Interspeziesvariabilität ist zu berücksichtigen, dass die Toxizität durch eine pH-Wertsenkung vermittelt wird. Für eine solche Wirkung kann eine geringere Variabilität der Toxikodynamik zwischen Individuen angenommen werden. Außerdem waren die Wirkungen im olfaktorischen Epithel meistens nur minimal ausgeprägt. Daher wird der Standardfaktor auf 1/3 reduziert.

Extrapolationsschritte:

Interspeziesextrapolation	1
Zeitextrapolation	1/2
Intra- und Interspeziesvariabilität	1/3
$50 \text{ mg/m}^3 \times 1 \times 1/2 \times 1/3 = 8 \text{ mg/m}^3$	

Es resultiert ein Grenzwert von 8 mg/m^3 (1,2 ppm) für das Gemisch und die einzelnen Ester.

Da eine lokale Wirkung bei der Grenzwertableitung im Vordergrund steht, werden die DBE bezüglich der Spitzenbegrenzung in die Kategorie I eingeordnet. Die Wirkungen beim LOAEL sind nur schwach ausgeprägt, daher wird ein Überschreitungsfaktor von 2 als angemessen betrachtet. Die DBE werden in die Schwangerschaftskategorie Y eingeordnet.

14 Abbildungen und Tabellen

Tabelle 1: V_{\max}/k_m -Werte der Hydrolyse dibasischer Ester in Homogenaten der Nasenschleimhaut von Ratten (aus Bogdanffy und Frame (1994); modifiziert nach Bogdanffy et al. (1991))

	Respiratorisches Epithel		Olfaktorisches Epithel	
	V_{\max}/k_m in nmol/min/mg/mM		V_{\max}/k_m in nmol/min/mg/mM	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Dimethylsuccinat	61 ± 14	31 ± 2	376 ± 32	184 ± 22
Dimethylglutarat	93 ± 3	133 ± 55	1051 ± 5	1162 ± 50
Dimethyladipat	378 ± 221	250 ± 21	1418 ± 420	2373 ± 231

Tabelle 2: Hydrolyse der dibasischen Ester zu Monomethylestern durch Homogenate der Nasenschleimhaut von Menschen und weiblichen Ratten (aus Bogdanffy und Frame (1994))

	Respiratorisches Epithel		Olfaktorisches Epithel	
	V_{\max} in nmol/min/mg		V_{\max} in nmol/min/mg	
	Mensch	weibliche Ratte	Mensch	weibliche Ratte
Dimethylsuccinat	nd-1,14	110 ± 4	nd-2,73	1461 ± 50
Dimethylglutarat	nd	600 ± 65	nd-10,25	3519 ± 90
Dimethyladipat	nd-1,66	385 ± 7	nd-2,52	4199 ± 20

nd: not detectable

Tabelle 3: Inzidenzen der Plattenepithelmetaplasie im olfaktorischen Epithel der Nasenhöhle von Ratten nach 14 Wochen Exposition gegen ein DBE-Gemisch (Dupont Co 1986, Kelly et al. 1986)

weibliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	160 mg/mg ³	400 mg/m ³	1000 mg/m ³
Zahl der Tiere	10	10	10	10
Plattenepithelmetaplasie, insgesamt	-	2 (20%)	9 (90%)	10 (100%)
- minimal	-	2 (20%)	5 (50%)	-
- leicht	-	-	3 (30%)	10 (100%)
- mäßig	-	-	1 (10%)	-

männliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	160 mg/mg ³	400 mg/m ³	1000 mg/m ³
Zahl der Tiere	10	10	10	10
Plattenepithelmetaplasie, insgesamt	-	1 (10%)	8 (80%)	9 (90%)
- minimal	-	1 (10%)	4 (40%)	2 (20%)
- leicht	-	-	4 (40%)	7 (70%)
- mäßig	-	-	-	-

Tabelle 4: Inzidenzen der Plattenepithelmetaplasie im olfaktorischen Epithel der Nasenhöhle von Ratten nach 22 Wochen Exposition gegen ein DBE-Gemisch in einer Verpaarungsstudie (Dupont Co 1986, Kelly et al. 1986)

weibliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	160 mg/mg ³	400 mg/m ³	1000 mg/m ³
Zahl der Tiere	20	20	20	20
Plattenepithelmetaplasie, insgesamt	3 (15 %)	12 (60 %)	15 (75 %)	20 (100 %)
- minimal	2 (10 %)	7 (35 %)	6 (30 %)	1 (5 %)
- leicht	1 (5 %)	5 (25 %)	7 (35 %)	13 (65 %)
- mäßig	-	-	2 (10 %)	6 (30 %)

männliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	160 mg/mg ³	400 mg/m ³	1000 mg/m ³
Zahl der Tiere	20	20	20	20
Plattenepithelmetaplasie, insgesamt	5 (25 %)	7 (35 %)	16 (80 %)	18 (90 %)
- minimal	5 (25 %)	7 (35 %)	7 (35 %)	1 (5 %)
- leicht	-	-	9 (45 %)	14 (70 %)
- mäßig	-	-	-	3 (15 %)

Tabelle 5: Inzidenzen der Veränderungen in der Nasenhöhle von Ratten nach 7 Wochen Exposition gegen ein DBE-Gemisch (Keenan et al. 1990, Dupont 1987f, EPL 2009).

weibliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	20 mg/mg ³	76 mg/m ³	390 mg/m ³
Zahl der Tiere	10	10	11	10
Tiere ohne Veränderungen	2 (20 %)	5 (50 %)	3 (27 %)	1 (10 %)
Olfaktorisches Epithel				
Tiere mit Veränderungen	1 (10 %)	1 (10 %)	2 (18 %)	9 (90 %)
Ebene II Degeneration				
- minimal	1 (10 %)	1 (10 %)	2 (18 %)	2 (20 %)
- leicht	-	-	-	7 (70 %)

- mäßig	-	-	-	-
Ebene III Degeneration				
- minimal	-	-	-	3 (33 %)
- leicht	-	-	-	1 (10 %)
- mäßig	-	-	-	-
Ebene IV Degeneration				
- minimal	-	-	-	3 (33 %)
- leicht	-	-	-	-
- mäßig	-	-	-	-
Hyperplasie der Basalzellen				
- minimal	-	-	-	2 (20 %)
Respiratorisches Epithel				
Ebene I , Plattenepithelmetaplasie				
- minimal	2 (20 %)	2 (20 %)	1 (9 %)	4 (40 %)
Sonstige Wirkungen				
Hyperplasie des submukosalen lymphoidalen Gewebes				
- minimal	7 (70 %)	4 (40 %)	6 (55 %)	7 (70 %)
- leicht	1 (10 %)	-	2 (18 %)	2 (20 %)

Tabelle 5 (Fortsetzung): Inzidenzen der Veränderungen in der Nasenhöhle von Ratten nach 7 Wochen Exposition gegen ein DBE-Gemisch (Keenan et al. 1990, Dupont 1987f, EPL 2009).

männliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	20 mg/mg ³	76 mg/m ³	390 mg/m ³
Zahl der Tiere	10	10	11	10
Tiere ohne Veränderungen	1 (10 %)	1 (10 %)	1 (9 %)	1 (10 %)
Olfaktorisches Epithel				
Tiere mit Veränderungen	-	1 (10 %)	2 (18 %)	8 (80 %)
Ebene II, Degeneration				
- minimal	-	1 (10 %)	1 (9 %)	2 (20 %)
- leicht	-	-	-	6 (60 %)
- mäßig	-	-	-	-
Ebene III, Degeneration				
- minimal	-	-	1 (9 %)	3 (30 %)
- leicht	-	-	-	-
- mäßig	-	-	-	-
Ebene IV , Degeneration				
- minimal	-	-	2 (18 %)	1 (10 %)
- leicht	-	-	-	-
- mäßig	-	-	-	-

Respiratorisches Epithel				
Ebene I, Plattenepithelmetaplasie				
- minimal	3 (30 %)	5 (50 %)	3 (27 %)	5 (50 %)
- leicht	-	-	1 (9 %)	-
Entzündung, suppurativ				
- minimal	-	-	1 (9 %)	2 (20%)
Sonstige Wirkungen				
Hyperplasie des submukosalen lymphoidalen Gewebes				
- minimal	1 (10 %)	2 (20 %)	5 (45 %)	1 (10 %)
- leicht	8 (80 %)	6 (60 %)	5 (45 %)	6 (60 %)

Tabelle 6: Inzidenzen der Veränderungen in der Nasenhöhle von Ratten nach 13 Wochen Exposition gegen ein DBE-Gemisch (Keenan et al. 1990, Dupont 1987f, EPL 2009)

weibliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	20 mg/mg ³	76 mg/m ³	390 mg/m ³
Zahl der Tiere	20	20	19	20
Tiere ohne Veränderungen	6 (30 %)	8 (40 %)	4 (21 %)	1 (5 %)
Olfaktorisches Epithel				
Tiere mit Veränderungen	3 (15 %)	6 (30 %)	8 (42 %)	19 (95 %)
Ebene II, Degeneration				
- minimal	-	5 (25 %)	2 (11 %)	3 (15 %)
- leicht	-	-	3 (16 %)	9 (45 %)
- mäßig	-	-	-	6 (30 %)
Ebene II, Respiratorische Metaplasie				
- leicht	1 (5 %)			1 (5 %)
Ebene II, Vakuolisierung/ Reduzierung der neuronalen Zellen				
- minimal	1 (5 %)			
- leicht	1 (5 %)			
Ebene III, Degeneration				
- minimal	1 (5 %)	1 (5 %)	2 (11 %)	7 (35 %)
- leicht	-	-	-	5 (25 %)
- mäßig	-	-	-	-
Ebene IV , Degeneration				
- minimal	-	-	3 (16 %)	5 (25 %)
- leicht	-	-	-	2 (10 %)
- mäßig	-	-	-	-
Respiratorisches Epithel				
Ebene I, Plattenepithelmetaplasie				
- minimal	4 (20 %)	4 (20 %)	2 (11 %)	5 (25 %)
- leicht	1 (5 %)		2 (11 %)	

Entzündung, suppurativ - minimal - leicht	- 1 (5 %)	1 (5 %) -	1 (5 %) -	1 (5 %)
Entzündung, subakut - minimal	-	1 (5 %)	-	
Wirkungen am Plattenepithel				
Entzündung, suppurativ - minimal	-	1 (5 %)	-	
Sonstige Wirkungen				
Hyperplasie des submukosalen lymphoidalen Gewebes - minimal - leicht	11 (55 %) 1 (5 %)	6 (30 %) 2 (10 %)	11 (58 %)	7 (35 %)
Exudat, suppurativ	1 (5 %)	-	1 (5 %)	
Entzündung, chronisch aktiv, nasolakrimaler Gang - mäßig	-	1 (5 %)		
Periodontitis, chronisch aktiv - mäßig			1 (5 %)	

Tabelle 6: (Fortsetzung): Inzidenzen der Veränderungen in der Nasenhöhle von Ratten nach 13 Wochen Exposition gegen ein DBE-Gemisch (Keenan et al. 1990, Dupont 1987f, EPL 2009)

männliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	20 mg/mg ³	76 mg/m ³	390 mg/m ³
Zahl der Tiere	20	20	19	20
Tiere ohne Veränderungen	1 (5 %)	6 (30 %)	2 (11 %)	0
Olfaktorisches Epithel				
Tiere mit Veränderungen	-	-	6 (32 %)	18 (90 %)
Ebene II, Degeneration - minimal - leicht - mäßig	- - -	- - -	5 (26 %) - -	4 (20 %) 9 (45 %) 4 (20 %)
Ebene III, Degeneration - minimal - leicht - mäßig	- - -	- - -	1 (5 %) - -	7 (35 %) 5 (25 %) 1 (5 %)
Ebene IV, Degeneration - minimal - leicht - mäßig	- - -	- - -	1 (5 %) - -	8 (40 %) 4 (20 %) -
Ebene IV, Entzündung, chronisch - minimal	-	-	1 (5 %)	-

Hyperplasie der Basalzellen - minimal	-	-	-	7 (35 %)
Respiratorisches Epithel				
Ebene I, Plattenepithelmetaplasie				
- minimal	5 (25 %)	8 (40 %)	4 (21 %)	9 (45 %)
- leicht	2 (10 %)	-	1 (5 %)	2 (10 %)
- mäßig	1 (5 %)	1 (5 %)	-	1 (5 %)
Entzündung, suppurativ				
- minimal	3 (15 %)	3 (15 %)	1 (5 %)	4 (20 %)
- leicht	1 (5 %)	-	1 (5 %)	2 (10 %)
Entzündung, chronisch aktiv				
- minimal	-	1 (5 %)	1 (5 %)	
- leicht		1 (5 %)	-	
Entzündung, subakut				
- minimal	-	1 (5 %)	-	
Wirkungen am Plattenepithel				
Entzündung, suppurativ				
- leicht	1 (5 %)	-	-	-
Sonstige Wirkungen				
Hyperplasie des submukosalen lymphoidalen Gewebes				
- minimal	11 (55 %)	5 (25 %)	13 (58 %)	10 (50 %)
- leicht	8 (40 %)	4 (20 %)	-	3 (15 %)
- mäßig	-	-	-	1 (5 %)
Exudat, suppurativ	1 (5 %)	1 (5 %)	1 (5 %)	3 (15 %)

Tabelle 7: Inzidenzen der Veränderungen in der Nasenhöhle von Ratten nach 13 Wochen Exposition gegen ein DBE-Gemisch und 6 Wochen Erholungsphase (Keenan et al. 1990, Dupont 1987f, EPL 2009)

weibliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	20 mg/mg ³	76 mg/m ³	390 mg/m ³
Zahl der Tiere	10	10	10	10
Tiere ohne Veränderungen	7 (70 %)	7 (70 %)	3 (30 %)	0
Olfaktorisches Epithel				
Tiere mit Veränderungen	-	3 (30 %)	5 (50 %)	10 (100 %)
Ebene II, Degeneration				
- minimal	-	-	-	-
- leicht	-	-	-	1 (10 %)
- mäßig	-	-	-	-
Ebene II, Respiratorische Metaplasie				
- minimal	-	2 (20 %)	1 (10 %)	1 (10 %)
- leicht	-	-	2 (20 %)	2 (20 %)
- mäßig	-	-	-	-

Ebene II, Vakuolisierung/Reduzierung der neuronalen Zellen				
- minimal	-	1 (10 %)	-	-
- leicht	-	1 (10 %)	2 (20 %)	3 (30 %)
- mäßig	-	1 (10 %)	-	-
Ebene III, Disorganisation				
- minimal	-	-	1 (10 %)	8 (80 %)
- leicht	-	-	-	-
- mäßig	-	-	-	-
Ebene IV, Disorganisation				
- minimal	-	1 (10 %)	1 (10 %)	7 (70 %)
- leicht	-	-	-	1 (10 %)
- mäßig	-	-	-	-
Hyperplasie der Basalzellen				
- minimal	-	-	-	1 (10 %)
Respiratorisches Epithel				
Ebene I, Plattenepithelmetaplasie				
- minimal		1 (10 %)	1 (10 %)	
- leicht		-	-	
- mäßig		-	-	
Sonstige Wirkungen				
Hyperplasie des submukosalen lymphoidalen Gewebes				
- minimal	2 (20 %)		4 (40 %)	4 (40 %)
- leicht	1 (10 %)			1 (10 %)
- mäßig	-			-
Periodontitis, chronisch aktiv				
- leicht	-	-	1 (10 %)	-

Tabelle 7: (Fortsetzung): Inzidenzen der Veränderungen in der Nasenhöhle von Ratten nach 13 Wochen Exposition gegen ein DBE-Gemisch und 6 Wochen Erholungsphase (Keenan et al. 1990, Dupont 1987f, EPL 2009)

männliche Ratten

Dosis	0 mg/m ³	20 mg/mg ³	76 mg/m ³	390 mg/m ³
Zahl der Tiere	10	10	10	10
Tiere ohne Veränderungen	1 (10 %)	5 (50 %)	4 (40 %)	3 (30 %)
Olfaktorisches Epithel				
Tiere mit Veränderungen	1 (10 %)	1 (10 %)	2 (20 %)	7 (70 %)
Ebene II , Degeneration				
- minimal			1 (10 %)	-
- leicht			-	1 (10 %)
- mäßig			-	-

Ebene II, Respiratorische Metaplasie				
- minimal	-	1 (10 %)	-	1 (10 %)
- leicht	-	-	-	3 (30 %)
- mäßig	-	-	-	-
Ebene II, Vakuolisierung/Reduzierung der neuronalen Zellen				
- minimal	-	-	1 (10 %)	-
- leicht	-	-	1 (10 %)	1 (10 %)
- mäßig	-	-	-	-
Ebene III Degeneration				
- minimal	1 (10%)	-	-	-
Ebene III , Disorganisation				
- minimal	-	-	1 (10 %)	1 (10 %)
- leicht	-	-	-	-
- mäßig	-	-	-	-
Ebene IV, Disorganisation				
- minimal	-	-	-	2 (20 %)
- leicht	-	-	-	-
- mäßig	-	-	-	-
Ebene IV, Entzündung, subakut				
- minimal	-	-	-	1 (10 %)
Respiratorisches Epithel				
Ebene I, Plattenepithelmetaplasie				
- minimal	2 (20 %)	1 (10 %)	-	1 (10 %)
- leicht	-	1 (10 %)	1 (10 %)	-
- mäßig	-	-	-	-
Entzündung, suppurativ				
- leicht	-	-	1 (10 %)	-
Plattenepithel				
Entzündung, suppurativ				
- minimal	1 (10 %)	1 (10 %)	1 (10 %)	-
Sonstige Wirkungen				
Hyperplasie des submukosalen lymphoidalen Gewebes				
- minimal	3 (30 %)	2 (20 %)	5 (50 %)	3 (30 %)
- leicht	4 (40 %)	3 (30 %)	-	2 (20 %)
Exudat, suppurativ				
- leicht	-	1 (10 %)	1 (10 %)	-
Dermatitis, subacut				
- leicht	1 (10 %)	-	-	-

Tabelle 7 b: Zahl der Tiere mit Veränderungen im olfaktorischen Epithel der verschiedenen Teilstudien von Keenan et al. 1990, Dupont 1987f und EPL 2009

Expositionszeit	0 mg/m ³	20 mg/mg ³	76 mg/m ³	390 mg/m ³
Weibliche Ratten				
	1 (10 %)	1 (10 %)	2 (18 %)	9 (90 %)
13 Wochen	3 (15 %)	6 (30 %)	8 (42 %)	19 (95 %)
13 Wochen + 6 Wochen Recovery	-	3 (30 %)	5 (50 %)	10 (100 %)
Männliche Ratten				
7 Wochen	-	1 (10 %)	2 (18 %)	8 (80 %)
13 Wochen	-	-	6 (32 %)	18 (90 %)
13 Wochen + 6 Wochen Recovery	1 (10 %)	1 (10 %)	2 (20 %)	7 (70 %)

Tabelle 8: Inzidenzen der Veränderungen in der Nasenhöhle von Ratten nach 90-Tagen Exposition gegen DMA, DMG und DMS (Dupont 2000, EPL 2009)

weibliche Ratten

	0 mg/m ³	10 mg/m ³ DMG	49 mg/m ³ DMG	410 mg/m ³ DMG	400 mg/m ³ DMS	390 mg/m ³ DMA
Zahl der Tiere	10	10	9	10	10	10
Tiere mit Veränderungen in der Nase	-	-	-	10 (100 %)	6 (60 %)	6 (60 %)
Nase I & II						
keine Veränderungen	10 (100 %)	10 (100 %)	9 (100 %)	2 (20 %)	7 (70 %)	5 (50 %)
olfaktorisches Epithel: Degeneration/Atrophie - minimal	-	-	-	6 (60 %)	3 (30 %)	3 (30 %)
- leicht	-	-	-	2 (20 %)	-	-
respiratorische Metaplasie - minimal	-	-	-	2 (20 %)	-	1 (10 %)
respiratorisches Epithel: Degeneration - minimal	-	-	-	1 (10 %)	-	-
Nase III & IV						
keine Veränderungen	10 (100 %)	10 (100 %)	9 (100 %)	2 (20 %)	5 (50 %)	7 (70 %)
olfaktorisches Epithel: Degeneration/Atrophie - minimal	-	-	-	7 (70 %)	5 (50 %)	3 (30 %)
- leicht	-	-	-	1 (10 %)	-	-
respiratorische Metaplasie - minimal	-	-	-	2 (20 %)	-	-

männliche Ratten

	0 mg/m ³	10 mg/m ³ DMG	49 mg/m ³ DMG	410 mg/m ³ DMG	400 mg/m ³ DMS	390 mg/m ³ DMA
Zahl der Tiere	10	10	10	12	10	10
Tiere mit Veränderungen in der Nase	-	-	-	10 (83 %)	7 (70 %)	4 (40 %)
Nase I & II						
keine Veränderungen	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	3 (25 %)	5 (50 %)	8 (80 %)
olfaktorisches Epithel: Degeneration/Atrophie						
- minimal	-	-	-	6 (50 %)	4 (40 %)	-
- leicht	-	-	-	3 (25 %)	1 (10 %)	-
respiratorische Metaplasie						
- minimal	-	-	-	1 (8 %)	1 (10 %)	1 (10 %)
- leicht	-	-	-	-	-	-
- mäßig	-	-	-	-	-	1 (10 %)
Nase III & IV						
keine Veränderungen	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	2 (17 %)	4 (40 %)	8 (80 %)
olfaktorisches Epithel: Degeneration/Atrophie						
- minimal	-	-	-	9 (75 %)	6 (60 %)	2 (20 %)
- leicht	-	-	-	1 (8 %)	-	-

Tabelle 9: Inzidenzen der Veränderungen in der Nasenhöhle von Ratten nach 90-Tagen Exposition gegen DMA, DMG und DMS und 4 Wochen Erholungsphase (Dupont 2000, EPL 2009)

weibliche Ratten

	0 mg/m ³	10 mg/m ³ DMG	49 mg/m ³ DMG	410 mg/m ³ DMG	400 mg/m ³ DMS	390 mg/m ³ DMA
Zahl der Tiere	10			10	10	10
Tiere mit Veränderungen in der Nase	-			7 (70 %)	7 (70 %)	1 (10 %)
Nase I & II						
keine Veränderungen	10 (100 %)			6 (60 %)	4 (40 %)	10 (100 %)
olfaktorisches Epithel: Degeneration/Atrophie						
- minimal	-			3 (30 %)	6 (60 %)	-
- leicht	-			-	-	-
respiratorische Metaplasie						
- minimal	-			2 (20 %)	3 (30 %)	-
Nase III & IV						
keine Veränderungen	10 (100 %)			4 (40 %)	6 (60 %)	9 (90 %)
olfaktorisches Epithel: Degeneration/Atrophie						
- minimal	-			6 (60 %)	4 (40 %)	1 (10 %)
- leicht	-			-	-	-

männliche Ratten

	0 mg/m ³	10 mg/m ³ DMG	49 mg/m ³ DMG	410 mg/m ³ DMG	400 mg/m ³ DMS	390 mg/m ³ DMA
Zahl der Tiere	10			9	10	10
Tiere mit Veränderungen in der Nase	4 (40 %)			4 (44 %)	5 (50 %)	9 (90 %)
Nase I & II						
keine Veränderungen	7 (70 %)			5 (56 %)	5 (50 %)	2 (20 %)
olfaktorisches Epithel: Degeneration/Atrophie - minimal - leicht respiratorische Metaplasie - minimal	- - 3 (30 %)			1 (11 %) 3 (33 %) 2 (22 %)	5 (50 %) - 1 (10 %)	8 (80 %) - 3 (30 %)
Nase III & IV						
keine Veränderungen	9 (90 %)			7 (78 %)	6 (60 %)	6 (60 %)
olfaktorisches Epithel: Degeneration/Atrophie - minimal respiratorische Metaplasie - minimal Entzündung, suppurativ - minimal	1 (10 %) - 1 (10 %)			2 (22 %) - -	4 (40 %) - -	4 (40 %) 1 (10 %) -

Tabelle 10: Hormonspiegel in männlichen Ratten nach 90-Tagen Exposition gegen DMA, DMG und DMS (Dupont 2000)

männliche Ratten

	0 mg/m ³	10 mg/m ³ DMG	49 mg/m ³ DMG	410 mg/m ³ DMG	400 mg/m ³ DMS	390 mg/m ³ DMA
Testosteron (ng/ml)	2,2±0,9 ^a	1,8±1,2	1,3±0,4*	1,1±0,4^{b*}	2,6±2,4	1,7±1,0
Luteinisierendes Hormon (LH) (ng/ml)	1,7±0,4	1,6±0,4	1,4±0,4	1,2±0,2*	1,5±0,5	1,5±0,4
Follikelstimulierendes Hormon (FSH) (ng/ml)	10,4±1,2	10,8±1,5	9,7±2,3	10,4±1,3	11,6±2,7	10,2±1,9

a: Mittelwert ±Standardabweichung. Die Zahl der Tiere ist 10 (wenn nicht anders beschrieben)

b: n = 9

*: Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05) nach Jockheere's Test.

Tabelle 11: Hormonspiegel in weiblichen Ratten nach 90-Tagen Exposition gegen DMA, DMG und DMS (Dupont 2000)

weibliche Ratten

	0 mg/m ³	10 mg/m ³ DMG	49 mg/m ³ DMG	410 mg/m ³ DMG	400 mg/m ³ DMS	390 mg/m ³ DMA
Östradiol (pg/ml)	50,6±31,8 ^a	25,7±21,1	23,0±13,1 ^b	37,2±29,0	21,8±26,9*	35,8±23,4
Progesteron (ng/ml)	21,1±17,1	18,8±11,5	22,5±11,4 ^b	18,5±6,0	29,2±14,9	21,4±10,2

a: Mittelwert ±Standardabweichung. Die Zahl der Tiere ist 10 (wenn nicht anders beschrieben)

b: n = 9

*: Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05) nach Mann-Whitney Test.

Tabelle 12: Zahl der Nebenhodenspermien (in Millionen) (Dupont 2000)

	0 mg/m ³	10 mg/m ³ DMG	49 mg/m ³ DMG	410 mg/m ³ DMG	400 mg/m ³ DMS	390 mg/m ³ DMA
Pro Cauda S. D.	332,7 80,53	299,2 112,22	435,4* 51,20	421,9* 62,63	509,2* 121,8	413,5 71,02
Pro Gramm Cauda S. D.	1243,0 343,63	1042,8 374,12	1541,9* 124,84	1542,9* 223,46	1753,6* 374,33	1415,7 130,74

* Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05) mit nonparametrischem Test (Dunn's)

Die Zahl der Tiere ist 10.

Tabelle 13: Inhalationsstudien mit DBE und den einzelnen Estern

Spezies, Stamm (Zahl der Tiere)	Studiendauer	Dosierung (mg/m ³)	NOEL (mg/m ³)	LOEL (mg/m ³) kritische Wirkung beim LOEL	Autor
DBE-Studien					
CrI:CD/BR Ratten (10/10)	14 Wochen	0; 160; 400; 1000	-	160 minimale Plattenepithelmetaplasien im olfaktorischen Epithel	Dupont Co 1986
CrI:CD/BR Ratten (20/20)	ca. 22 Wochen, Verpaarungs- studie	0; 160; 400; 1000	-	160 minimale bis leichte Plattenepithelmetaplasien im olfaktorischen Epithel	Dupont Co 1987b
CrI:CD/BR- Ratten (10/10)	7 Wochen	0; 20; 76; 390	20	76 minimale Degenerationen im olfaktorischen Epithel	Keenan et al. 1990, Dupont 1987f, EPL 2009
CrI:CD/BR- Ratten (20/20)	13 Wochen (± 6 Wochen Recovery)	0; 20; 76; 390	-	20 (♀ der Recovery-Gruppe) einzelne minimale bis mäßige Degenerationen im olfaktorischen Epithel	Keenan et al. 1990, Dupont 1987f. EPL 2009 ⁸

⁸ Die Eignung der Studie von Keenan et al. 1990/Dupont 1987f/EPL 2009, minimale Wirkungen sicher zu identifizieren, ist fraglich.

Studien mit DMG					
Crl:CD(SD)IG S BR-Ratten (10/10)	90 Tage (± 4 Wochen Recovery)	0; 10; 49; 410	Systemische Wirkungen		Dupont 2000
			10	49 (♂) Senkung der Serumspiegel von Testosteron und LH, Erhöhung der Spermienzahl im Nebenhoden	
			Lokale Wirkungen		
			49	410 minimale bis leichte Degenerationen im olfaktorischen Epithel	
Studien mit DMA					
Crl:CD(SD)IG S BR-Ratten (10/10)	90 Tage (± 4 Wochen Recovery)	390	-	390 minimale Degenerationen im olfaktorischen Epithel (ein Tier: mäßig)	Dupont 2000
Studien mit DMS					
Crl:CD(SD)IG S BR-Ratten (10/10)	90 Tage (± 6 Wochen Recovery)	400	Systemische Wirkungen		Dupont 2000
			-	400 Senkung der Serumspiegel von Östradiol, Erhöhung der Spermienzahl im Nebenhoden	
			Lokale Wirkungen		
			-	400 minimale Degenerationen im olfaktorischen Epithel (ein Tier: leicht)	

15 Literatur

- [1] Andersen und Sarangapani (2001) Physiological based clearance/extraction models for compounds metabolized in the nose. Inhal. Toxicol., 13 397-414
- [2] Andersen et al. (2002) Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models for nasal tissue dosimetry of organic esters: assessing the state-of-knowledge and risk assessment applications with methyl methacrylate and vinyl acetate. Reg. Toxicol. Pharm., 36, 234-245
- [3] Anon (1998) Kriterien für die Ableitung von gesundheitsbasierten Luftgrenzwerten bei limitierter Datenlage Bundesarbeitsblatt 10/98, 74-76
- [4] Bogdanffy et al. (1998) Analysis of vinyl acetate metabolism in rat and human nasal tissues by an in vitro gas uptake technique. Toxicol. Sci., 46, 235-246
- [5] Bogdanffy und Londergan (1989) Inhibition of mitochondrial ATP synthesis by dibasic esters in vitro Toxicologist, 9(1):249 (abstract 996)
- [6] Bogdanffy et al. (1991) Metabolism of dibasis esters by rat nasal mucosal carboxylesterase Drug Metab. Dispos., 19(1):124-129

- [7] Bogdanffy und Frame (1994) Olfactory mucosal toxicity. integration of morphological and biochemical data in mechanistic studies: dibasic esters as an example. Inhal. Toxicol., 6 (Supplement):205-218
- [8] Chapin und Conner (1998) Testicular histology and sperm parameters. An evaluation and interpretation of reproductive endpoints for human health risk assessment. pp 28-41. ILSI HESI, Washington, D.C.
- [9] Dupont Co. (1986) Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No. 194-86
- [10] Dupont Co (1987a) Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No. 562-87
- [11] Dupont Co (1987b) Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No. 76-87
- [12] Dupont Co. (1987c) Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No. 584-87 beschrieben in: EPA (2002)
- [13] Dupont Co. (1987d) Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No. 531-87
- [14] Dupont Co. (1987e) Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No. 498-87
- [15] Dupont Co. (1987f) Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No. 312-87
- [16] Dupont Co. (2000) Unpublished Data, Haskell Laboratory MR-13128-1, Dupont-3557
- [17] Dupont Co. (2003) Unpublished Data, Haskell Laboratory, Laboratory Project ID: DuPont-10657
- [18] EC-ECB (2000) IUCLID-Datensatz, <http://ecb.jrc.it/esis>
- [19] EPA (2002) Justification of Dibasic Esters (DBE) Category and Overview of DBE Robust Summaries
<http://www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/dbe/c13453.pdf>
<http://www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/dbe/c13453tc.htm>
- [20] EPL (2009) Experimental Pathology Laboratories, Inc., Pathology peer review of "nasal tissue slides from two 90-day studies on behalf of INVISTA, EPL project No.: 851-001, Amended pathology report, September 18, 2009
- [21] Hartwig, A. (2006) Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatz-Konzentrationen), Bernsteinsäure-, Adipinsäure- und Glutarsäuredimethylester und deren Gemisch, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Wiley-VCH. Weinheim 2006.
- [22] Hinderliter et al. (2005) Validation of human physiologically based pharmacokinetic model for vinyl acetate against human nasal dosimetry data Toxicol Sci., 85(1), 460-467
- [23] Huntington Life Sciences Ltd (2001a) Dimethyl glutarate rat micronucleus test. Submitted to SOCMA 16 May 2001. SOA 002/004851
- [24] Huntington Life Sciences Ltd (2001b) Dimethyl glutarate rat micronucleus test. Submitted to SOCMA 16 May 2001. SOA 002/004851
- [25] Huntington Life Sciences Ltd (2001c) Dimethyl adipate rat micronucleus test. Submitted to SOCMA 16 May 2001. SOA 001/004850

- [26] Kalberlah und Hassauer (2003) Vergleich der Verfahren zur Ableitung gesundheitsbezogener Wirkungsschwellen (Benchmark - NOAEL), Forschungs- und Entwicklungsvorhaben UBA-FKZ 201 65 201/01
- [27] Kee et al. (1989) Sex and species differences in metabolism of dibasic esters by nasal carboxylesterase *The Toxicologist*, 9(1):284 (abstract 1139)
- [28] Keenan et al. (1990) Degeneration and recovery of rat olfactory epithelium following inhalation of dibasic esters. *Fund. Appl. Toxicol.*, 15, 381-393
- [29] Kelly et al. (1986) *The Toxicologist*, 6 (1):136 (Abstract 551)
- [30] MacDonald et al. (1989) Effect of Esters of Succinic acid and other citric acid cycle intermediates in insulin release and inositol phosphate formation by pancreatic islets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 269, 400-406
- [31] Mainwaring et al. (2001) Methyl methacrylate toxicity in rat nasal epithelium: studies of the mechanism of action and comparison between species. *Toxicology*, 158, 109-118
- [32] Malaisse und Sener (1993a) Respiratory, ionic and functional effects of succinate esters in pancreatic cells. *Am. J. Physiol.* 264 (Endocrinol. Metab. 27) E428-E433
- [33] Malaisse et al. (1993b) Metabolic effects and fate of succinate esters. *Am. J. Physiol.* 264 (Endocrinol. Metab. 27) E434-E440
- [34] Monsanto (1992) One-month gavage study of DME (Dimethylester) in Sprague Dawley rats. report # MSL-12509 beschrieben in: EPA (2002)
- [35] Montelius (1999) Criteria group for occupational standards. Consensus report for dimethyl adipate, dimethyl glutarate and dimethyl succinate. *Arbete och Hälsa* 22: 39-47
- [36] Morris, J B et al. (1991) Deposition of dibasic esters in the upper respiratory tract of the male and female Sprague-Dawley rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108 (3), 538-546
- [37] Olsen et al. (1993) Immunohistochemical localisation of carboxylesterase in the nasal mucosa of rats. *J. Histochem. Cytochem.* 41(2):307-311
- [38] Patterson et al. (1988) Kinetics of nasal mucosal carboxylesterase-mediated hydrolysis of dibasic esters. *The Toxicologist*, 8(1) abstract 22
- [39] Retallack et al. (1991) Cytotoxicity of dibasic esters (DBE) metabolites in rat nasal explants *The Toxicologist*, 11(1) abstract 664
- [40] Trela und Bogdanffy (1990) Carboxylesterase-dependent cytotoxicity of dibasic esters (DBE) in rat nasal explants. *The Toxicologist*, 10(1) abstract 1044
- [41] Trela und Bogdanffy (1991a) Carboxylesterase-dependent cytotoxicity of dibasic esters in rat nasal explants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107, 285-301
- [42] Trela und Bogdanffy (1991b) Cytotoxicity of dibasic esters (DBE) metabolites in rat nasal explants *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 110(2):259-267
- [43] TRGS 900 (2006) Kapitel 2.3 http://www.baua.de/nn_5846/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/Technische-Regeln-fuer-Gefahrstoffe-_28TRGS_29/TRGS_20900__content.html__nnn=true

- [44] Vlachos et al. (1988) Evaluation of dibasic esters (DBE), a new class of industrial solvents, in a genotoxicity test battery. *Environ Mol Mutagen.*, 11 (suppl. 11):109