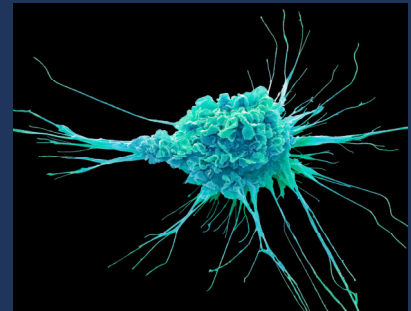


# Sensibilisierung nach DIN EN ISO 10993-10 Anhang C

## Tierversuchsfreie Verfahren zur Prüfung auf Hautsensibilisierung

Die Anstrengungen, die Verwendung von Tieren in Toxizitätsprüfungen zu verringern oder zu ersetzen, haben zur Entwicklung verschiedener tierversuchsfreier Verfahren zur Risikobewertung geführt.



## Methoden für die Prüfung auf Hautsensibilisierung

### Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

#### Schlüsselvorgang 1: Kovalente Proteinbindung

Der DPRA ist ein *in chemico*-Verfahren, bei dem die Reaktivität einer Prüfchemikalie oder eines Produktextrakts durch deren Abreicherung von synthetischen cystein- oder lysinhaltigen Peptiden quantitativ bestimmt wird.

Die prozentualen Peptid-Abreicherungswerte für Cystein und Lysin werden bestimmt und in einem Vorhersagemodell einer von vier Reaktivitätsklassen zugeordnet, wodurch das geprüfte Produkt als sensibilisierend oder nicht hautsensibilisierend eingestuft wird.

### IL-18-RhE-Test

#### Schlüsselvorgang 2: Reaktion von Keratinozyten

Die Hautsensibilisierung wird *in vitro* durch Messung der basalen Freisetzung von Interleukin-18 (IL-18) nach Aufbringen eines Produktextraktes auf rekonstruierte humane Epidermis (RhE) bewertet. Im Kulturmedium der RhE wird IL-18 mittels der ELISA-Methode quantitativ bestimmt. Parallel wird die Lebensfähigkeit der Zellen durch den MTT-Versuch gemessen (Prüfung kombinierbar mit der Prüfung auf Hautirritation nach DIN EN ISO 10993-23).

### U937 CELL LINE ACTIVATION TEST (U-SENS™)

#### Schlüsselvorgang 3: Aktivierung epidermaler dendritischer Zellen

U-SENS™ ist eine *in vitro*-Methode, bei der die Änderungen der Expression des Zelloberflächenmarkers CD86 mittels Durchflusszytometrie an einer humanen Zelllinie (U937-Zellen) quantitativ bestimmt werden.

## Die Tests eignen sich besonders für

- Medizinprodukte (Material-unabhängig)
- Textilien im Gesundheitswesen

## Ihr Nutzen als Auftraggeber

- Nachweis der Konformität des Medizinprodukts mit der Medizinprodukteverordnung (Voraussetzung zur CE-Kennzeichnung)
- Bestandteil der Biologischen Beurteilung und Risikobewertung Ihres Medizinprodukts
- Produktoptimierung
- Verbrauchersicherheit
- Minimierung von Reklamationen

## Anforderungen an Prüfmuster

### Allgemein

- Bei konfektionierten Mustern das Gesamtprodukt einsenden
- Beim Versenden von mehreren Mustern darauf achten, dass Inhaltsstoffe nicht auf andere Muster übergehen, d.h. separat in Kunststoffbeutel verpacken
- Ausreichend genaue Bezeichnungen (Materialzusammensetzung, Artikelnummer etc.) des Prüfmusters angeben

### Materialmenge

- Mindestens 80 g des Prüfmusters bzw. mind. 3 Gesamtprodukte pro Prüfung

### Prüfdauer

- In der Regel 25-30 Arbeitstage; Terminbestätigung nach Prüfmuster-Eingang

## Hintergrund

### Adverse Outcome Pathway der Hautsensibilisierung

Die Vorhersage der Hautsensibilisierung beim Menschen beruht darauf, mehrere einzelne Prüfungen in Versuchsstrategien zu kombinieren, da keine der validierten tierversuchsfreien Prüfungen allein in der Lage ist, das komplizierte Netzwerk der zugrunde liegenden Mechanismen vollständig zu reproduzieren. Die OECD hat die nacheinander ablaufenden Ereignisse, die zu einer hautsensibilisierenden Wirkung führen, beschrieben. Diese Reihe von Ereignissen wird als AOP (Adverse Outcome Pathway) bezeichnet.

**Der AOP für die Hautsensibilisierung beschreibt vier Schlüsselvorgänge**, wobei die Schlüsselvorgänge 1 bis 3 in der Risikobewertung nach DIN EN ISO 10993-10 Anhang C als tierversuchsfreie Alternativmethoden beschrieben sind.

**Schlüsselvorgang 1 – Kovalente Bindung an Hautproteine:** das auslösende molekulare Ereignis nach dem Durchdringen des Stratum corneum ist die irreversible Bildung des Hapten-Protein-Komplexes.

**Schlüsselvorgang 2 – Reaktion von Keratinozyten:** dieser Schlüsselvorgang geht mit der Aktivierung von biochemischen Prozessen in den Keratinozyten einher und umfasst mit Entzündungsmediatoren verbundene Reaktionen sowie Änderungen der Genexpression in Verbindung mit Zellsignalketten, z.B. die Bildung von Interleukin (IL-)18.

**Schlüsselvorgang 3 – Aktivierung dendritischer Zellen:** die detaillierten biochemischen Ereignisse nach der Bildung des Hapten-Protein-Komplexes sind nicht vollständig aufgeklärt. Wirkungen auf zellulärer und Gewebeebene sind ebenfalls nicht vollständig bekannt, umfassen jedoch epidermale Reaktionen, die Folgendes einschließen:

- 1) Immunerkennung von chemischen Allergenen durch Keratinozyten, spezialisierte epidermale dendritische Zellen (d. h. Langerhans'sche Zellen) und dermale dendritische Zellen;
- 2) Antworten in Form einer Expression von spezifischen Zelloberflächenmarkern, wie z. B. CD86 auf U937 Zellen.

**Schlüsselvorgang 4 – T-Zellproliferation:** auf der Organebene (Lymphknoten und Haut) sind folgende Reaktionen bekannt:

- 1) Migration von dendritischen Zellen zum Lymphknoten, wo das Antigen präsentiert wird, um naive T-Lymphozyten (T-Zellen) zu aktivieren, und
- 2) Differenzierung und Proliferation von T-Zellen zu allergenspezifischen T-Effektor- und T-Gedächtniszellen.

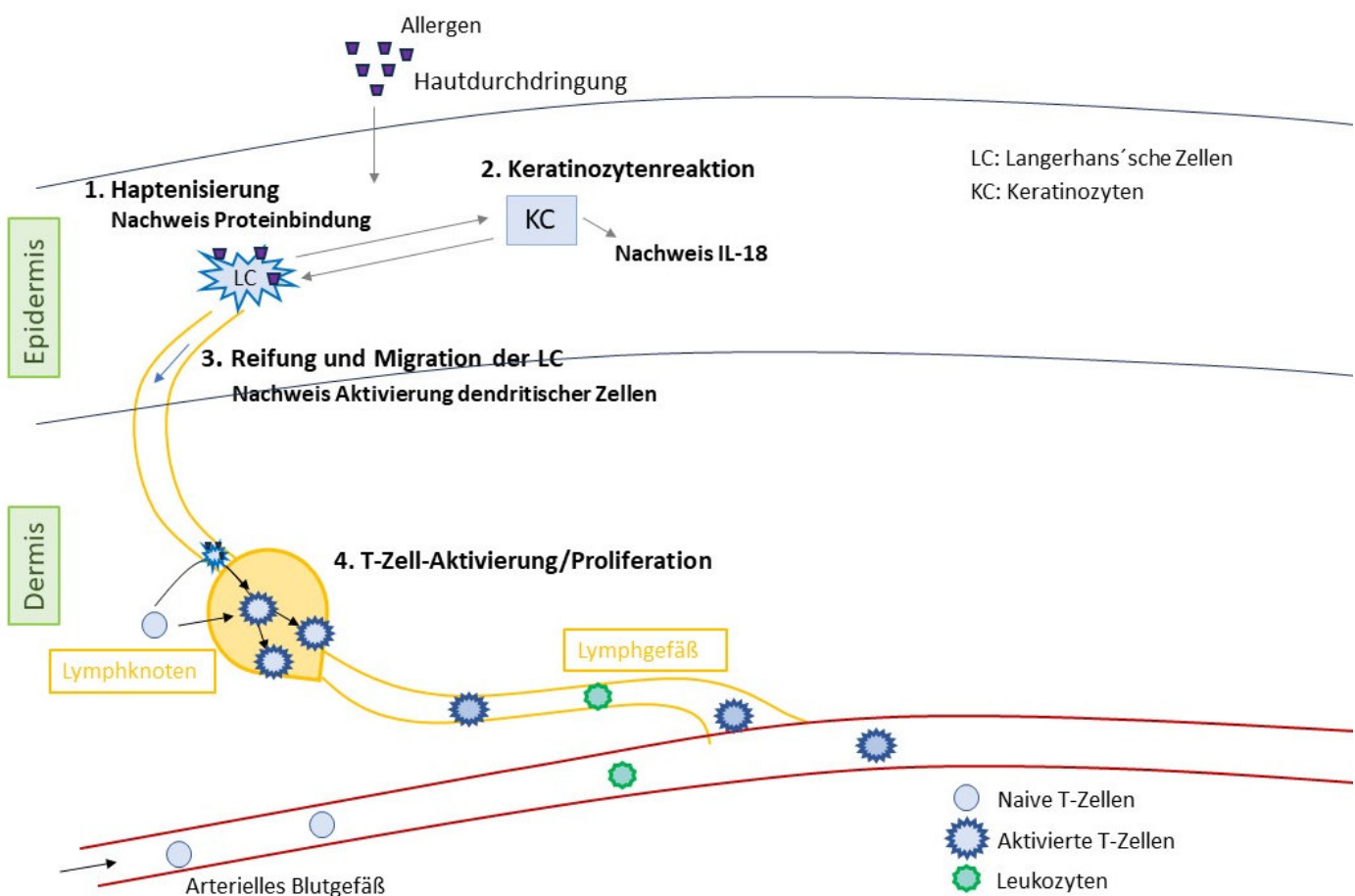


Abbildung: Schlüsselvorgänge entlang des AOP der Hautsensibilisierung