

**HATÓANYAGOK BŐRSZENZIBILIZÁCIÓS  
POTENCIÁLJÁNAK ÉRTÉKELÉSE IN VITRO  
VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI ALAPJÁN**

**Sebestyén István**

**TOX'2018 konferencia, Lillafüred**



# A bőrszenzibilizációs tulajdonságok vizsgálata

---

- Az UN GHS (United Nations Globally Harmonized System) definíciója alapján bőrszenzibilizáló hatásúnak nevezünk minden olyan anyagot, mely a bőrrel való érintkezés során allergiás reakciót vált ki.
- Az allergiás kontakt dermatitisz korunk egyik leggyakoribb betegsége.
- Az elmúlt években jelentős tudományos eredményeket sikerült elérni a bőrszenzibilizációval kapcsolatos alternatív vizsgálati módszerek kidolgozása terén.
- Ezek a vizsgálati módszerek, a az OECD 442C, D és E módszerek - lehetővé tehetik azoknak a megfelelő információknak a megszerzését, amelyek segítségével in vivo vizsgálat nélkül is megállapítható, hogy egy adott anyag okoz-e bőrszenzibilizációt.

# Vegyai anyagok regisztrációs adatkövetelménye

---

A REACH rendelet kifejezetten támogatja az in vivo kísérletek számának csökkentését, a kísérleti állatok számának csökkentését az in vivo tesztekben, illetve az ún. alternatív vizsgálati módszerek fejlesztését ezen tesztek in vitro tesztekkel történő kiváltásának céljából. Az új információk előállítása során alkalmazandó módszereket szintén rendeletben szabályozták:

- **A BIZOTTSÁG (EU) 2017/735 RENDELETE (2017. február 14.) az alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK rendeletnek a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítás céljából történő módosításáról**
- **A BIZOTTSÁG (EU) 2016/1688 RENDELETE (2016. szeptember 20.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet VII.mellékletének a bőrszenzibilizáció tekintetében történő módosításáról**

# Vegyai anyagok regisztrációs adatkövetelménye

---

**A BIZOTTSÁG (EU) 2016/1688 kimondja a bőrszenzibilizáció tekintetében történő módosításáról**

- **(5)Az állatkísérletek számának csökkentése érdekében indokolt módosítani az 1907/2006/EK rendelet VII. mellékletének 8.3. pontját, hogy lehetővé váljon az alternatív vizsgálati módszerek felhasználása, amennyiben az említett megközelítéssel megszerezhetők a megfelelő információk és amennyiben a rendelkezésre álló vizsgálati módszerek alkalmazhatók a vizsgálni kívánt anyag vonatkozásában.**

# Vegyai anyagok regisztrációs adatkövetelménye

---

- **A BIZOTTSÁG (EU) 2017/706 RENDELETE (2017. április 19.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet VII. mellékletének a bőrszenzibilizáció tekintetében történő módosításáról, valamint az (EU) 2016/1688 bizottsági rendelet hatályon kívül helyezéséről:**

(6) A jelenleg rendelkezésre álló, az OECD által elfogadott alternatív vizsgálati módszerek egy kedvezőtlen kimeneteli lehetőségen (adverse outcome pathway, AOP) alapulnak, amely a bőrszenzibilizáció kialakulásáról meglévő hatásmechanizmusra vonatkozó ismereteket írja le. E módszereket nem önmagukban, hanem más módszerekkel kombinálva kell alkalmazni. A bőrszenzibilizáció átfogó értékeléséhez tipikusan az AOP első három főbb eseményét elemző módszereket kell igénybe venni.

# Vegyai anyagok regisztrációs adatkövetelménye

Az 1907/2006/EK rendelet VII. melléklete 8.3. pontjának helyébe a következő szöveg lép:

<p>„8.3. Bőrszenzibilizáció</p> <p>Információk, amelyek lehetővé teszik:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>— annak megállapítását, hogy az anyag bőrszenzibilizáló-e, valamint annak értékelését, hogy az anyagról feltételezhető-e, hogy jelentős emberi szenzibilizáló hatás (1A kategória) kifejtésére képes, valamint</li><li>— a kockázatelemzést, ahol elő van írva.</li></ul>	<p>A 8.3.1. és a 8.3.2. pont szerinti vizsgálato(ka)t nem kell elvégezni, ha:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>— az anyag besorolása szerint a »bőrkorrózió« veszélyességi osztályba (1. kategória) tartozik, vagy</li><li>— az anyag erős sav (<math>\text{pH} \leq 2,0</math>) vagy lúg (<math>\text{pH} \geq 11,5</math>), vagy</li><li>— az anyag szobahőmérsékleten, levegővel, vízzel vagy nedvességgel érintkezve öngyulladóvá válhat.</li></ul>
<p>8.3.1. Bőrszenzibilizáció – <i>in vitro/in chemico</i> vizsgálat</p> <p>A 13. cikk (3) bekezdése alapján elismert olyan <i>in vitro/in chemico</i> vizsgálati módszer(ek) alapján szerzett információk, amely(ek) kiterjed(nek) a bőrszenzibilizáció valamennyi alábbi főbb eseményére:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>a) molekuláris kölcsönhatás bőrproteinekkal;</li><li>b) keratinsejtek gyulladáshoz vezető válaszütemének;</li><li>c) dendritikus sejtek aktiválása.</li></ol>	<p>E vizsgálat(oka)t nem kell elvégezni, ha:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>— rendelkezésre áll egy, a 8.3.2. pont szerinti <i>in vivo</i> vizsgálat, vagy</li><li>— a rendelkezésre álló <i>in vitro/in chemico</i> vizsgálati módszerek nem alkalmazhatóak az anyagra vagy nem alkalmasak a 8.3. pont szerinti osztályozás vagy kockázatelemzés céljaira.</li></ul> <p>Ha az 1. oszlopban szereplő főbb események közül egyet vagy kettőt elemző vizsgálati módszer(ek) alapján szerzett információk már lehetővé teszik a 8.3. pont szerinti osztályozást és kockázatelemzést, más főbb esemény(ek)e) elemző egyéb vizsgálatokat nem szükséges elvégezni.</p>

# Vegyianyagok regisztrációs adatkövetelménye

## 8.3.2. Bőrszenzibilizáció – *in vivo* vizsgálat

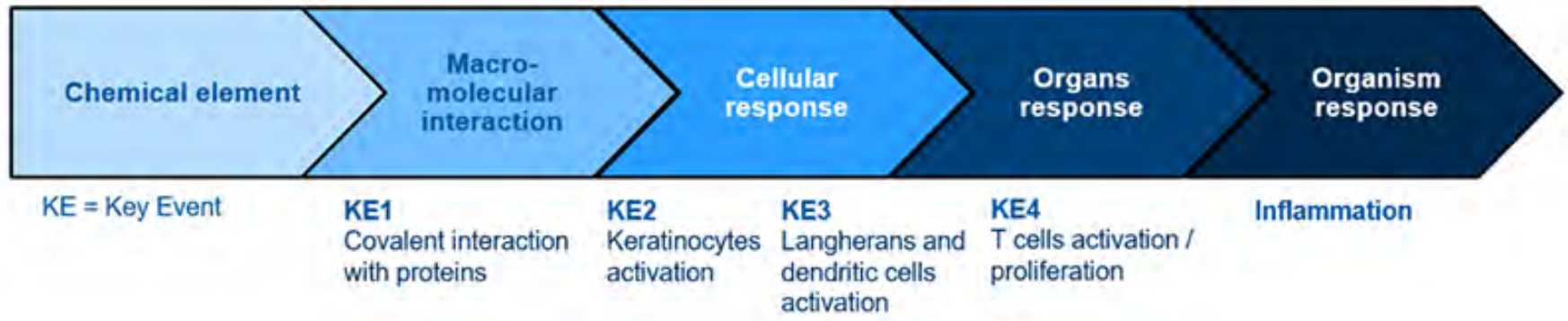
*In vivo* vizsgálatot csak akkor kell végezni, ha a 8.3.1. pontban ismertetett *in vitro/in chemico* vizsgálati módszerek nem alkalmazhatók vagy az e vizsgálatokból nyert eredmények nem alkalmasak a 8.3. pont szerinti osztályozás vagy kockázatértékelés céljaira.

Az *in vivo* vizsgálatra az elsődleges módszer az egereken végzett helyi nyirokcsomó-vizsgálat (LLNA). Ettől eltérő vizsgálat kizárólag rendkívüli körülmények fennállása esetén alkalmazható. Eltérő *in vivo* vizsgálat alkalmazását meg kell indokolni.

Azokat a 2017. május 10-nél korábban elvégzett vagy megkezdett *in vivo* bőrszenzibilizáló vizsgálatokat, amelyek megfelelnek a 13. cikk (3) bekezdésének első albekezdésében és a 13. cikk (4) bekezdésében megállapított követelményeknek, úgy kell tekinteni, mint amelyek alkalmasak ezen egységesen előírt információs követelmény teljesítésére.”

# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok

Az in vitro bőrszenzibilizációs vizsgálatok kedvezőtlen kimeneteli lehetőségen (adverse outcome pathway, AOP) alapulnak:

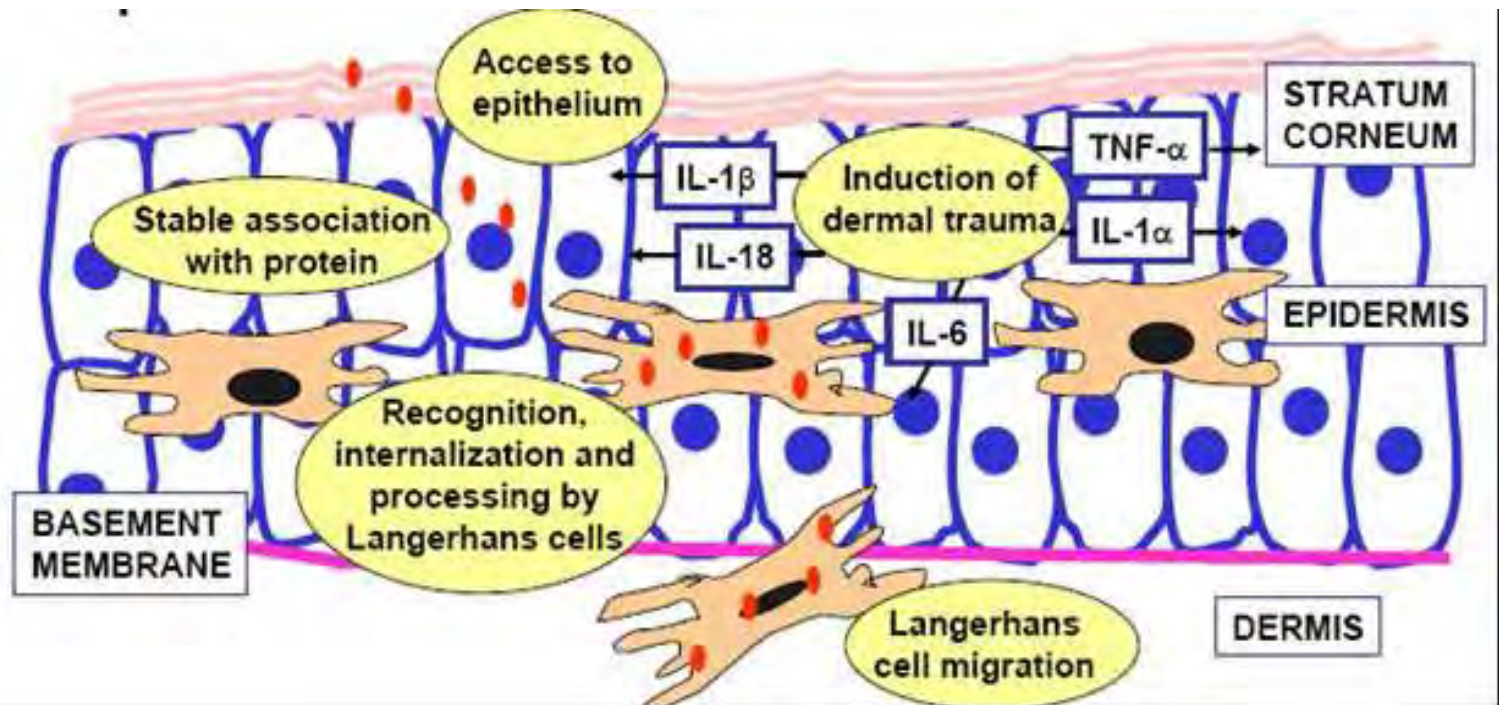


A szenzibilizáció során a bőrön át a szervezetbe jutó kis molekula-tömegű anyag (haptén) az epidermiszben jelenlévő fehérje-molekulákhoz (hordozó) kötődik. Az így kialakuló komplexet a Langerhans-sejtek bekebelezik és a közeli nyirokcsomóba szállítják, ahol a prezentáció eredményeként memória T-sejtek keletkeznek.

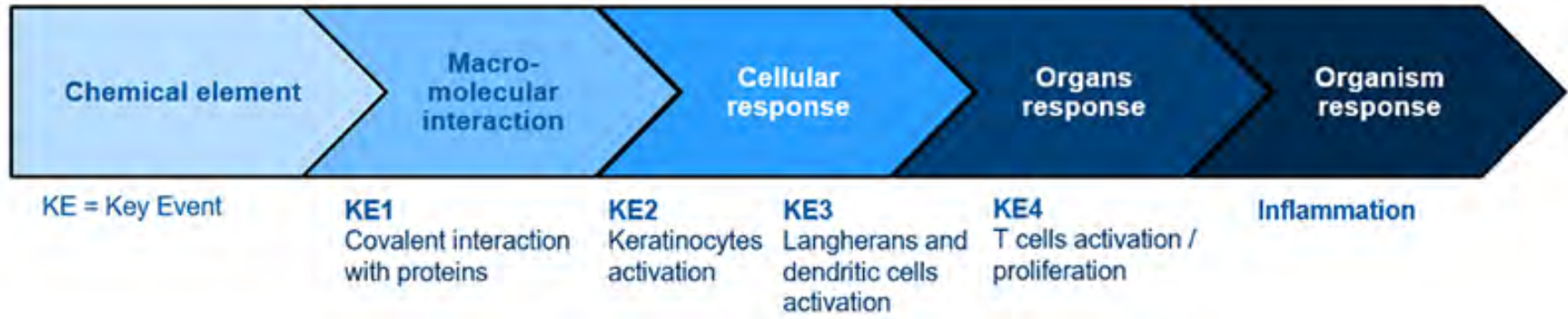


## In vitro szenzibilizációs vizsgálatok

A memória T-sejtek az ugyanazon antigénnel való másodszori találkozás – az elicitáció – során citokineket termelnek. Ez az epidermisz keratinocitáit is aktiválja, amelyek ennek eredményeként antigén prezentáló sejtként (APC) is működnek. A sejtek közötti kölcsönhatások eredményeként keletkező citokinek hatására gyulladás alakul ki, ami duzzanatot, vörösödést, viszketést okoz.

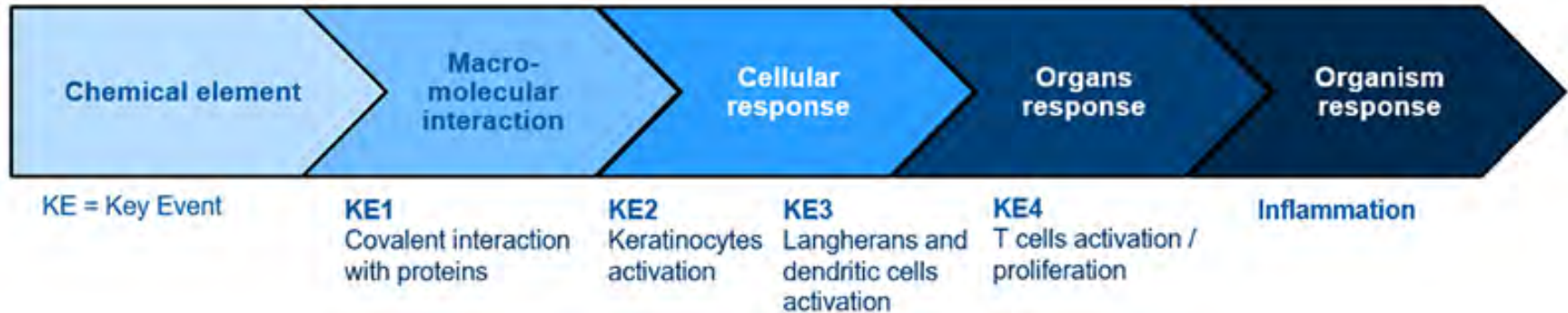


# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok



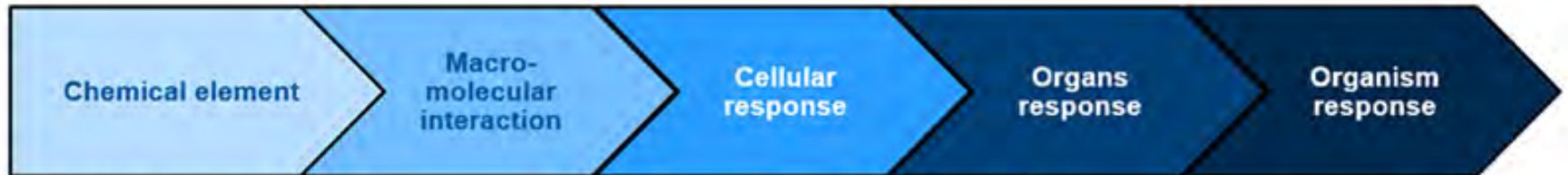
AOP Key event measured <sup>59</sup>	Test method	Validation status, regulatory acceptance	EU Test Methods/ OECD test guideline	Outcome according to the test method/guideline	EURL ECVAM DB-ALM protocol Nr.
<b>Skin sensitisation</b>					
<b>Key Event 1</b> Peptide/protein binding	DPRA	Validated and regulatory acceptance	B.59/TG 442C	SS or NS with complementary information	154

# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok



<b>Key Event 2</b> Keratinocyte response	KeratinoSens™	Validated and regulatory acceptance	B.60/TG 442D	SS or NS with complementary information	155
	LuSens <sup>60</sup>	Under validation assessment	N.A/N.A	SS or NS with complementary information	184
	SENS-IS <sup>61</sup>	Under validation assessment	N.A/N.A	SS or NS with complementary information	N.A

# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok



KE = Key Event

**KE1**

Covalent interaction with proteins

**KE2**

Keratinocytes activation

**KE3**

Langherans and dendritic cells activation

**KE4**

T cells activation / proliferation

**Inflammation**

<b>Key Event 3</b> Monocytic /Dendritic cell response	h-CLAT	Validated and regulatory acceptance	N.A/TG 442E	SS or NS with complementary information	158
	U-SENS <sup>TM60</sup>	Validated and under regulatory adoption	N.A/draft TG available	SS or NS with complementary information	183
	IL-8 Luc Assay <sup>62</sup>	Validated and under regulatory adoption	N.A/draft TG available	SS or NS with complementary information	N.A.
<b>Key Event 4<sup>63</sup></b> T-cell response	N.A	N.A	N.A/N.A	N.A.	N.A.

# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok

A Toxi-Coop Zrt. a vizsgálatok beállítása során elvégzett 10 referencia anyaggal való vizsgálatot. A referencia értékek LLNA vizsgálati adatokon alapulnak.

DPRA	Predicion* and Reference ranges for cysteine/lysine depletion values (%)	DPRA results with obtained cysteine/lysine depletion values (%)
2,4-Dinitrochlorobenzene	sensitiser (90-100 / 15-45)	positive (100 / 20)
Lactic Acid	non-sensitiser (0-7 / 0-5.5)	negative (5 / 0)
Oxazolone	sensitiser (60-80 / 10-55)	positive (82 / 52)
Formaldehyde	sensitiser (30-60 / 0-24)	positive (51 / 1)
Benzylideneacetone	sensitiser (80-100 / 0-7)	positive (85 / 7)
4-Methoxyacetophenone	non-sensitiser (0-7 / 0-5.5)	negative (1 / 0)
Famesal	sensitiser (15-55 / 0-25)	positive (46 / -)
2,3-Butadione	sensitiser (60-100 / 10-45)	positive (58 / 25)
1-Butanol	non-sensitiser (0-7 / 0-5.5)	negative (0 / 0)
6-Methylcoumarin	non-sensitiser (0-7 / 0-5.5)	negative (0 / 0)

Table 1. DPRA results

KeratinoSens™	Predicion* and Reference ranges for EC1.5 values (µM)	KeratinoSens results with obtained EC1.5 values (µM)
2,4-Dinitrochlorobenzene	sensitiser (<12.5)	positive (2.8)
Lactic Acid	non-sensitiser	negative
Glycerol	non-sensitiser	negative
Isopropanol	non-sensitiser	negative
2-Mercaptobenzothiazole	sensitiser (25-250)	positive (76)
Salicylic acid	non-sensitiser	negative
Ethylene glycol dimethacryl	sensitiser (5-125)	positive (52)
4-Methylamine ophenol sulfate	sensitiser (<12.5)	positive (7)
Methylidibromoglutaronitrile	sensitiser (<20)	positive (10)
Cinnamyl alcohol	sensitiser (25-175)	inconclusive

Table 2. KeratinoSens™ results

h-CLAT	Predicion* and Reference ranges for EC150/EC200 values (µg/mL)	h-CLAT results with obtained EC150/EC200 values (µg/mL)
2,4-Dinitrochlorobenzene	sensitiser (0.5-10 / 0.5-15)	positive (1.9 / 2.1)
Lactic Acid	non-sensitiser	negative
Glycerol	non-sensitiser	negative
Isopropanol	non-sensitiser	negative
2-Mercaptobenzothiazole	sensitiser (>10 / 10-140)	positive (96 / 84)
4-Phenylenediamine	sensitiser (<40 / >1.5)	positive (9 / 12)
4-Aminobenzoic acid	non-Sensitiser	negative
Nickel sulfate	sensitiser (<100 / 10-100)	positive (40 / 48)
R(+)-Limonene	sensitiser (>5 / <250)	positive (- / 349)
Imidazolidinyl urea	sensitiser (20-90 / 20-75)	positive (32 / 36)

Table 3. h-CLAT results

# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok értékelése

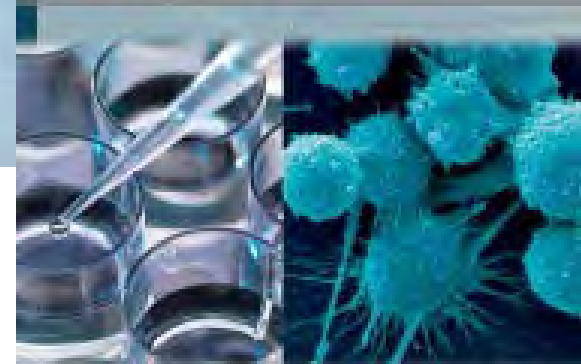
OECD TG 442C  
DPRA



OECD TG 442D  
KeratinoSens™



OECD TG 442E  
h-CLAT



# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok értékelése

---

OECD ENVIRONMENT DIRECTORATE

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

**Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and  
Individual Information Sources to Be Used within Integrated  
Approaches to Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation**

Series On Testing & Assessment

No. 256

# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok értékelése

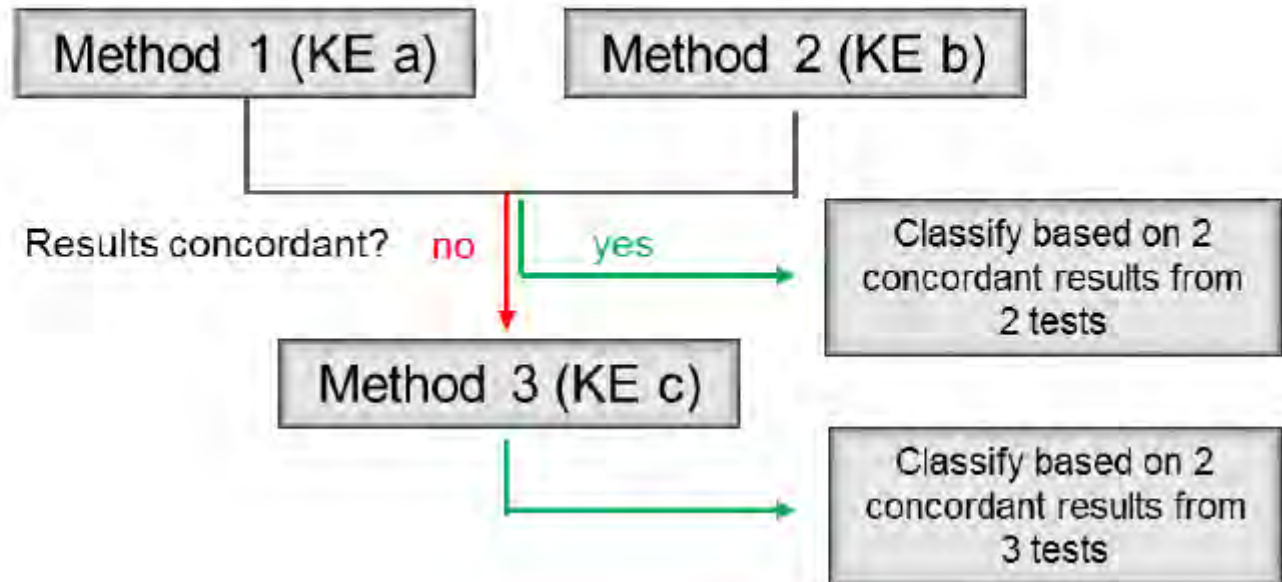
**Table 3:** Defined approaches to testing and assessment documented in Annex I.

Case study		Purpose
I	An Adverse Outcome Pathway-based "2 out of 3" integrated testing strategy approach to skin hazard identification (BASF)	Hazard identification
II	Sequential Testing Strategy (STS) for hazard identification of skin sensitisers (RIVM)	Hazard identification
III	A non-testing Pipeline approach for skin sensitisation (G. Patlewicz)	Hazard identification
IV	Stacking meta-model for skin sensitisation hazard identification (L'Oréal)	Hazard identification
V	Integrated decision strategy for skin sensitisation hazard (ICCVAM)	Hazard identification
VI	Consensus of classification trees for skin sensitisation hazard prediction (EC- JRC)	Hazard identification



# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok értékelése

ENV/JM/MONO(2016)29/ANN1



# In vitro szenzibilizációs vizsgálatok értékelése

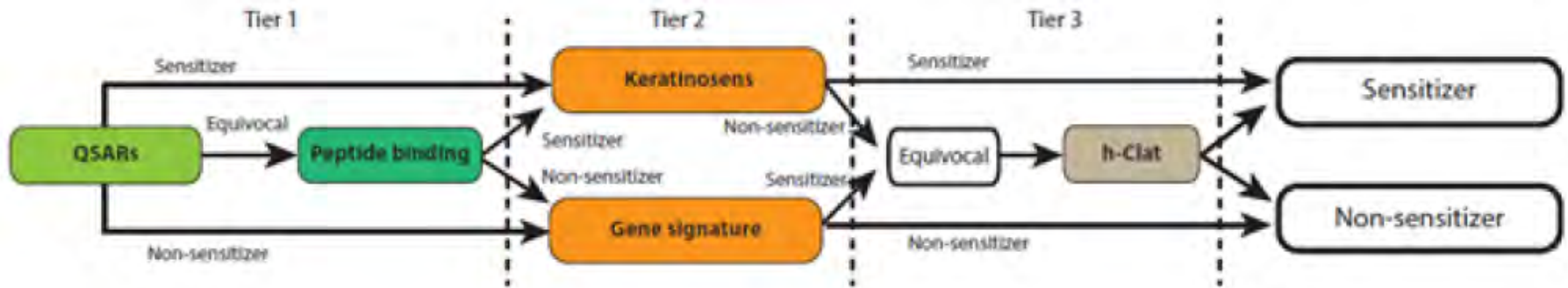


Figure II. 1: Schematic presentation of the RIVM STS.