

**ABSCHLUSSBERICHT:
IN-VITRO-TESTUNG DER
HAUTSENSIBILISIERENDEN WIRKSTÄRKE VON
INHALTSSTOFFEN AUS EPOXIDHARZSYSTEMEN
MIT SCHWERPUNKT DER TESTUNG SOGENANNTER
PRÄPOLYMERE (FP-451)**

erstellt im Auftrag von:

Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV)

Alte Heerstraße 111 • 53757 Sankt Augustin

Laufzeit: 01.03.2020 – 21.12.2020



Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH

Klarastraße 63 • 79106 Freiburg

Bearbeitung:

Dr. Karin Heine

September 2021

Kollaborationspartner und Danksagung

Die ausführende Forschungsstelle für das Forschungsprojekt FP-451 war die Eurofins BioPharma Product Testing Munich GmbH (Eurofins BPT Munich GmbH, Robert-Koch-Straße 3a, 82152 München Planegg, vertreten durch den Forschungsleiter Dr. Helge Gehrke). Eurofins BPT Munich GmbH führte die für die Projektdurchführung maßgeblichen In-vitro-Studien durch. FoBiG als Unterauftragnehmer und koordinierende Stelle, begleitete die Durchführung inhaltlich und leitete die übergreifende Datenauswertung. Der vorliegende Abschlussbericht wurde entsprechend von FoBiG mit Unterstützung durch Eurofins BPT Munich GmbH erstellt.

Neben der Finanzierung durch die DGUV wurde die Testung weiterer Stoffe bei der Eurofins BPT Munich GmbH durch Mitglieder aus dem Arbeitskreis Epoxidharz-Inhaltsstoffe (AK EIS) finanziert (in alphabetischer Reihenfolge: Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie (BG RCI); Deutsche Bauchemie e.V.; Epoxy Europe einer Branchengruppe des europäischen Verbands der chemischen Industrie (Cefic)). Die Testmaterialien wurden von der MC-Bauchemie Müller GmbH & Co. KG, Bottrop und Stauff Klebstoffwerk GmbH, Wilsdorf zur Verfügung gestellt.

Ein Dank geht an meinen Kollegen, Herrn Dr. Marco Dilger. Er hat die experimentellen Arbeiten als zusätzlicher Studienmonitor begleitet und zu den Themen Löslichkeit und Zytotoxizität beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Fritz Kalberlah. Er war bereits federführend an den Vorgängerprojekten beteiligt und hat das grundsätzliche Schema zur Neubewertung von Präpolymeren mitentwickelt. Dem aktuellen Forschungsvorhaben stand er als Diskussionspartner zur Verfügung und hat die abschließende Qualitätskontrolle durchgeführt.

Inhalt

Kurzfassung deutsch	5
Kurzfassung englisch	7
Abkürzungen	9
1 Problemstellung.....	12
2 Forschungszweck/-ziel	14
2.1 Hintergrund	14
2.1.1 Allergische Hauterkrankungen und Epoxidharzsysteme.....	14
2.1.2 Allergische Kontaktdermatitis – Mechanismen und Testmethoden.....	16
2.2 Forschungsziel und Zielgruppe	19
3 Methodik.....	21
3.1 Testmethode – GARD™	21
3.1.1 Allgemein	21
3.1.2 Testdurchführung	22
3.2 Testmaterialien.....	24
4 Ergebnisse der In-vitro-Testung	26
4.1 Daten und Auswertung	26
4.1.1 Löslichkeit	30
4.1.2 Zytotoxizität – GARD Input Finder Assay.....	30
4.1.3 Sensibilisierende Wirkstärke	30
4.2 Diskussion In-Vitro-Testung und praktische Anwendung der Ergebnisse	31
4.2.1 Generelle Eignung der GARD™-Testmethode	34
4.2.2 Löslichkeit	36
4.2.3 Zytotoxizität und Reizwirkung	37
4.2.4 Sensibilisierende Wirkstärke	40
4.2.5 Generelle Probleme von In-vitro-Testsystemen bzw. „New Approach Methodologies“ (NAM) zur Hautsensibilisierung	42
4.2.6 Praktische Anwendung der Wirkstärkenbewertung der Präpolymere	44
4.3 Zusammenfassung.....	54

5	Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen	57
6	Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen	58
7	Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan	59
7.1	Vorstellung von Teilergebnissen bei der EUROTOX 2021	59
7.2	Publikation in Fachzeitschrift	59
7.3	Handreichung für die differenzierte Anwendung des Gemischerechners bei der Bewertung von Präpolymeren	59
7.4	Anwendung und Überprüfung im Gemischerechner	60
8	Literatur.....	61
	Anhang.....	69

KURZFASSUNG DEUTSCH

Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen sind häufig Auslöser allergischer Hauterkrankungen (Allergische Kontaktdermatitis) bei Arbeitern verschiedener Branchen. Deshalb wird bereits seit einigen Jahren die Strategie verfolgt, diese Inhaltsstoffe gemäß ihrer sensibilisierenden Wirkstärke zu charakterisieren und eine Rangfolge für die Sensibilisierungsstärke aufzustellen. Mit diesem Vorgehen soll die Grundlage für Substitutionsentscheidungen geschaffen werden. Stark sensibilisierende Inhaltsstoffe sollen – falls technisch möglich - durch weniger stark sensibilisierende ersetzt werden.

Im Forschungsvorhaben galt es als Erstes, **Datenlücken für die Bewertung sogenannter Präpolymere zu schließen**. Die Präpolymere stellen eine erfolgsversprechende technische Neuerung zur Senkung der Allergiepotez von Epoxidharzsystemen dar. Grundsätzlich setzen sie sich aus einem adduktierten Aminanteil ($\text{Amin}_{\text{Addukt}}$), freiem Amin ($\text{Amin}_{\text{frei}}$) und Lösemittel in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zusammen. Die zu testenden Materialien wurden mittels eines In-vitro-Testsystems, dem „Genomic Allergen Rapid Detection“ (GARD)-Test geprüft. Das verwendete In-vitro-Testsystem ist adäquat für die untersuchten Inhaltsstoffe. Bei den Testungen waren Faktoren, die die Messung beeinflussen können wie z.B. Löslichkeit und Zytotoxizität ausreichend kontrolliert. Drei Testmaterialien werden der Kategorie Skin Sens 1B (Stoffe mit geringer sensibilisierender Potenz) zugeordnet. Dabei handelt es sich um a) Tetraethylenpentamin (TEPA; monomeres Amin), b) ein Präpolymer (TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt (DGEBA) in Benzylalkohol) und c) ein Polyamidoamin (Epamide 405, < 2 % freies Amin). Zwei weitere Präpolymere wurden in die Kategorie Skin Sens. 1A (starke Potenz) eingeordnet. Die Ergebnisse sind mechanistisch plausibel.

Die Kombination der Ergebnisse aus der In-vitro-Testung in diesem Forschungsvorhaben, mit Ergebnissen aus Vorgängerprojekten und vertraulichen Industriedaten erlaubt die **Ableitung pragmatischer Regeln für die verbesserte Bewertung ungetesteter Präpolymere**. Das zweite Ziel des Forschungsvorhabens ist entsprechend erfüllt. Während ungetestete Präpolymere im Standard mit HS (hoher Potenz) bewertet werden, kann nun bei Erfüllung der folgenden Regeln auch ohne stoffspezifische Daten davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Präpolymere eine geringe bis mäßige Wirkstärke (GMS) innehaben:

- I. > 30 % $\text{Amin}_{\text{Addukt}}$ und < 10 % $\text{Amin}_{\text{frei}}$ der Wirkstärke HS („stark sensibilisierend“)
- II. > 30 % $\text{Amin}_{\text{Addukt}}$ und <30 % $\text{Amin}_{\text{frei}}$ der Wirkstärke GMS („gering bis mäßig sensibilisierend“)

Bei beiden Regeln wird vorausgesetzt, dass das Lösemittel im Präpolymer keine sensibilisierende Wirkung aufweist.

Die Regeln sind für die Bewertung von DGEBA-Präpolymeren und Polyamidoaminen anzuwenden. In allen anderen Fällen ist von einer starken Potenz auszugehen, sofern keine Daten vorliegen, die das Gegenteil belegen. Ob diese Regeln ggfs. auf andere Präpolymertypen (mit anderer Harzbasis) ausgedehnt werden können, erfordert die Auswertung zusätzlicher experimenteller Daten und wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts nicht geprüft.

Die experimentellen Ergebnisse zu den Härter-Gemischen und zu den Präpolymeren bestätigen die grundsätzlichen Annahmen im „EIS-Gemischerechner“, einer Softwareanwendung, die in vorangegangenen Projekten und im Arbeitskreis Epoxidharz-Inhaltsstoffe (AK

EIS) entwickelt wurde. Die im aktuellen Forschungsvorhaben entwickelten pragmatischen Regeln können, bei Kenntnis der genauen Präpolymerzusammensetzung, in diesen EIS-Gemischerechner integriert und zu einer **differenzierten Bewertung von Produkten in Bezug auf ihre sensibilisierende Wirkung** herangezogen werden. Die Unfallversicherungsträger können den EIS-Gemischerechner ihren Mitgliedsbetrieben empfehlen. Die Fachkräfte für Arbeitssicherheit (Sifa) von Betrieben mit Epoxidharzanwendungen können unter Anwendung der neuen Regeln Substitutionsmöglichkeiten für die jeweiligen Arbeitsplätze identifizieren und entsprechende Anpassungen vornehmen. Der herstellenden Industrie bzw. den Formulierern von Epoxidharzsystemen können die Ergebnisse dieses Projektes in Verbindung mit dem EIS-Gemischerechner als Werkzeug zur Entwicklung weniger stark sensibilisierender Systeme dienen. Differenzierte Bewertungen von Produkten stellen einen Anreiz für die Entwickler von Epoxidharzsystemen dar, um verbesserte Rezepturen, die weniger stark sensibilisierend sind, zu entwerfen und auf den Markt zu bringen. Durch den Eingang der Daten in eine solche Bewertung ist das dritte Forschungsziel, **der Eingang der Ergebnisse in praxisorientierte Entscheidungshilfen**, erfüllt.

KURZFASSUNG ENGLISCH

Ingredients of epoxy resin systems are often triggers of allergic skin diseases (allergic contact dermatitis) in workers of different industries. For this reason, the strategy of characterising these ingredients according to their sensitising potency and establishing a ranking for sensitising potency has been pursued for several years. This approach is intended to provide the basis for substitution decisions. Highly sensitising ingredients should - if technically possible - be replaced by less sensitising ones.

The first task in the research project was to **close data gaps for the evaluation of so-called prepolymers**. The prepolymers represent a promising technical innovation for reducing the sensitising potency of epoxy resin systems. Basically, they are composed of an adducted amine portion ("Amine_{adduct}"), a free amine ("Amine_{free}") and solvent, in different proportions. The materials were tested using an in vitro test system, the "Genomic Allergen Rapid Detection" (GARD) test. The in vitro test system used is adequate for the ingredients tested. Factors that may influence the measurement, such as solubility and cytotoxicity, were adequately controlled in the tests. Three test materials are assigned to the category Skin Sens 1B (substances with low sensitising potency). These are a) tetraethylenepentamine (TEPA; monomeric amine), b) a prepolymer (TEPA- bisphenol A resin adduct (DGEBA) in benzyl alcohol) and c) a polyamidoamine (epamide 405, < 2 % free amine). Two other prepolymers were classified as Skin Sens. 1A (strong potency). The results are mechanistically plausible.

Combining the results from in vitro testing in this research project, with results from previous projects and confidential industry data, allows the **derivation of pragmatic rules for the improved evaluation of untested prepolymers**. The second objective of the research project has been met accordingly. While untested prepolymers are rated HS (high potency) in default, it can now be assumed that the corresponding prepolymers have a low to moderate potency (GMS) without substance-specific data, if the following rules are met:

- I. > 30% Amine_{adduct} and < 10% Amine_{free} of the potency HS ("strongly sensitising")
- II. > 30% Amine_{adduct} and <30% Amine_{free} of potency GMS ("low to moderate sensitising")

Both rules assume that the solvent in the prepolymer has no sensitising effect.

The rules are to be applied for the evaluation of DGEBA prepolymers and polyamidoamines. In all other cases, a strong potency is to be assumed unless data are available showing the contrary. Whether these rules can be extended to other prepolymer types (with other resin base) requires the evaluation of additional experimental data and was not within the scope of the present project.

The experimental results on the hardener mixtures and on the prepolymers confirm the basic assumptions in the "EIS mixture calculator", a software application developed in previous projects and in the epoxy resin ingredients working group ("Arbeitskreis Epoxidharz-Inhaltsstoffe", AK EIS). If the exact prepolymer composition is known, these pragmatic rules can be integrated into the "EIS mixture calculator" and used for a differentiated assessment of products with regard to their sensitising effect. The accident insurance institutions can recommend the EIS mixture calculator to their member companies. The occupational safety specialists (Sifa) of companies with epoxy resin applications can use the new rules to identify substitution options and make appropriate adjustments for the corresponding workplaces. For manufacturers of the formulators of epoxy resin systems the results of this project in

conjunction with the "EIS mixture calculator" can serve as a tool for developing less sensitising systems. Differentiated assessments of products provide an incentive for the developers of epoxy resin systems to design and market improved formulations that are less sensitising which is in favour of occupational safety. By incorporating the data into such an assessment, the third research objective, **the input of the results into practice-oriented decision-making aids, is also fulfilled.**

ABKÜRZUNGEN

1,3-BAC	1,3-Bis-aminomethylcyclohexan oder 1,3-Cyclohexylen-bis-methylamin, CAS-Nr. 2579-20-6
3-R-Prinzip	Grundsatzprinzip der experimentellen wissenschaftlichen Arbeit, erstmals veröffentlicht von Russel W, Burch R. „The principles of humane experimentation technique.“ (1959). Tierversuche sollen, wenn möglich vermieden („replace“), die Zahl der Tiere reduziert („reduce“) und deren Leiden auf das unerlässliche Maß beschränkt werden („refine“).
95%-KI	95 %-Konfidenzintervall
ACD	Allergische Kontaktdermatitis („allergic contact dermatitis“)
AK EIS	Arbeitskreis „Epoxidharz-InhaltsStoffe“
AOP	„adverse outcome pathway“, Reihenfolge von Ereignissen auf molekularer, zellulärer und Organebene, welche zu einem adversen Effekt im Organismus führen
AUVA	Allgemeine Unfallversicherungsanstalt; Dachverband der österreichischen UVT
BzOH	Benzylalkohol, CAS-Nr. 100-51-6
CAS-Nr.	Chemical Abstracts Service Nummer, ist ein internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe
CLP-VO	Einstufungs- und Kennzeichnungsverordnung („Classification, Labelling and Packaging“); Verordnung (EG) Nr. 1272/2008
DA	„defined approaches“, Konzept für die Prüfung und Bewertung eines festgelegten Sets an Testverfahren
DGEBA	Diglycidylether von Bisphenol A (DGEBA-Harz)
DMSO	Dimethylsulfoxid, CAS-Nr. 67-68-5
DGUV	Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung; Dachverband der deutschen UVT
DPRA	„Direct Peptide Reactivity Assay“, In-chemico-Testsystem
DV	„decision value“, Entscheidungswert im Vorhersagemodell des GARD™
ECVAM	siehe EURL ECVAM
EDA	Ethylendiamin, CAS-Nr. 107-15-3
EIS	Epoxidharz-InhaltsStoffe
ESAC	„EURL ECVAM scientific advisory committee“, EURL ECVAM wissenschaftlicher Beratungsausschuss
EURL ECVAM	„European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing“, Referenzlabor der Europäischen Union für Alternativen zu Tierversuchen
Eurofins BPT Munich GmbH	Eurofins BioPharma Product Testing Munich GmbH

FACS	„fluorescence-activated cell sorting“, Messverfahren im Bereich Biologie/Medizin zur Analyse bestimmter Merkmale von Zellen (z.B. Form, Struktur und/oder Färbung)
FoBiG	Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH
GARD™	„Genomic Allergen Rapid Detection“, In-vitro-Testsystem
GDA	„GARD Data Analysis Application“
GMS	Wirkstärkenkategorie: GMS; Stoffe denen eine geringe bis mäßige sensibilisierende Wirkstärke zugeordnet wird
GPMT	„Guinea pig maximisation test“, Meerschweinchenmaximierungstest; Tierversuch zur Bewertung der sensibilisierenden Wirkung von Substanzen
GPS	„GARD™ Prediction Signature“
h-CLAT	„Human Cell Line Activation Test“, In-vitro-Testsystem
HS	Wirkstärkenkategorie: HS; Stoffe denen eine hohe sensibilisierende Wirkstärke zugeordnet wird
IPD	Isophorondiamin oder 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin, CAS-Nr. 2855-13-2
IVDK	Informationsverbund Dermatologischer Kliniken zur Erfassung und wissenschaftlichen Auswertung der Kontaktallergien, umfasst Mitglieder aus Deutschland, Österreich und der Schweiz
JRC	„Joint Research Centre“, Gemeinsame Forschungsstelle der Europäischen Kommission
KE	„key event“, Schlüsselereignis – ein Ereignis in der Abfolge eines AOP
KeratinoSens	In-vitro-Testsystem zur Bewertung der sensibilisierenden Wirkung von Substanzen (siehe OECD TG 442D)
LLNA	„local lymph node assay“; lokaler Lymphknotentest an Mäusen, Tierversuch zur Bewertung der sensibilisierenden Wirkung von Substanzen
MXDA	m-Xylidendiamin, CAS-Nr. 1477-55-0
MIE	„molecular initiating event“, initiales Ereignis in der Abfolge eines AOP
MW	Mozytotxlekulargewicht in g/mol
OECD	„Organisation for Economic Cooperation and Development“
PolyH	Präpolymer, zusammengesetzt aus Bisphenol-A plus Epichlorhydrin in Lösemittel plus Amin (hier auch: DGEBA-Präpolymere), enthält entsprechend die folgenden Bestandteile Amin _{Addukt} , Lösemittel und Amin _{Aminfrei}
REACH-VO	EU-Chemikalienverordnung („Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals“); Verordnung (EG) Nr. 1907/2006
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäuren (RNS), Makromoleküle im Zellkern und Zytoplasma der Zellen,
RV90	„relative viability of 90%“

SenCeeTox	In-vitro-Testsystem mit 3D-Hautmodell zur Bestimmung der sensibilisierenden Wirkung einer Substanz
SENS-IS	In-vitro-Testsystem mit 3D-Hautmodell zur Bestimmung der sensibilisierenden Wirkung einer Substanz
SenzaCells	Verwendete Zelllinie einer In-vitro-Testung zur Bestimmung der sensibilisierenden Wirkung einer Substanz (GARD-Test); vgl. Abschnitt 3.1
SVM	„Support Vector Machine“, Algorithmus zur Auswertung von Daten
TEPA	Tetraethylenpentamin, CAS-Nr. 112-57-2
TETA	Triethylentetramin, CAS-Nr. 112-24-3
TG	„test guideline“, Prüfrichtlinie
TOFA	„Tall Oil Fatty Acid“, Tallöfetsäure, CAS-Nr. 61790-12-3
TRIzol	Eine chemische Lösung zur Extraktion von hochwertiger Gesamt-RNA oder auch DNA, RNA und Proteinen aus einer Vielzahl an biologischen Proben (z.B. wie im GARD™ von Säugetierzellen).
U	Wirkstärkenkategorie: U (unbekannt); Standardvorgehen bei zu wenig Daten wird einem Stoff eine hohe Sensibilisierungsstärke (HS) zugeordnet
UVT	Unfallversicherungsträger

1 PROBLEMSTELLUNG

Allergische Hauterkrankungen durch berufliche Exposition gegenüber sensibilisierenden Arbeitsstoffen stellen ein zentrales Problem im präventiven Arbeitsschutz dar und schlagen sich in einer hohen Anzahl entsprechender berufsbedingter Hauterkrankungen nieder (Brans et al., 2019; Fitzpatrick et al., 2018). Eine Substitution von hautsensibilisierenden Substanzen hat hohe Priorität. Bei vielen Inhaltsstoffen in Epoxidharzsystemen ist jedoch die Substitution sensibilisierender Arbeitsstoffe durch nicht-sensibilisierende Ersatzstoffe aus technischen Gründen keine Option. Deshalb sollten zumindest solche hautsensibilisierenden Stoffe ermittelt und eingesetzt werden, die eine deutlich schwächere Wirkstärke besitzen als manche derzeitige Inhaltsstoffe mit hoher sensibilisierender Potenz.

Bei der Einstufung von hautsensibilisierenden Stoffen nach CLP (EC, 2008) wird eine Differenzierung der Wirkpotenz (Klasse 1 A und B) angestrebt. Allerdings liegen zu zahlreichen hautsensibilisierenden Arbeitsstoffen bisher keine ausreichenden *In-vivo*-Daten (d.h. Humandaten oder Daten aus Tierexperimenten) vor, um eine aussagekräftige Wirkstärken-differenzierung vornehmen zu können. Neue *In-vivo*-Tests sind im Rahmen von REACH jedoch u.a. aus Gründen des Tierschutzes nicht möglich und unerwünscht.

Mittlerweile existieren geeignete und qualifizierte *In-vitro*-Testsysteme (chemische oder zellbasierte Testung im Reagenzglas), die eine Wirkstärkendifferenzierung der Klasse 1A und B ermöglichen (z.B. Cottrez et al., 2016; Zeller et al., 2017). Da jeder der Tests, jedoch nur Teilschritte des Sensibilisierungsprozesses abbildet, wird aktuell wissenschaftlich diskutiert, ob für eine Bewertung ein umfangreicher Datensatz mit mehreren Testbefunden erforderlich ist oder einer der Tests womöglich als „Stand-alone“ Test für eine Bewertung herangezogen werden kann (Natsch und Landsiedel, 2019; Roberts, 2018; 2019).

In Epoxidharzsystemen werden in jüngerer Zeit vermehrt sogenannte Präpolymere verwendet. In früheren Forschungsprojekten, z.T. von FoBiG (Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH) durchgeführt, wurde bereits festgestellt, dass diese Präpolymere eine geringere Wirkstärke als die entsprechenden Monomerkomponenten zu haben scheinen. Allerdings liegen noch sehr wenige Daten dazu vor. Die geringere Wirkstärke soll im vorliegenden Projekt durch die Anwendung eines neu entwickelten *In-vitro*-Testsystems zur Wirkstärkencharakterisierung von hautsensibilisierenden Arbeitsstoffen (GARD™, Details siehe 3) verifiziert werden. Beispielhaft für das Anwendungsgebiet von Epoxidharz-Inhaltsstoffen sollen drei solcher Präpolymere, ein Polyamidoamin und ein monomeres Aminhärter getestet und die erzielten Ergebnisse verglichen werden. Das Ergebnis sollte sich auch bei der Ermittlung der Gefährdungszahl für die sensibilisierende Wirkstärke von Gesamt-Epoxidharzsystemen im Gemischerechner¹ niederschlagen.

Die Möglichkeit der Verallgemeinerung und Ausdehnung der gewonnenen Erkenntnisse auf andere Präpolymere wird überprüft, um generelle Schlussfolgerungen zur Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke von Präpolymeren und ähnlichen Stoffen abzuleiten. Zudem werden auf Basis der Erkenntnisse praxisorientierte Entscheidungshilfen (z.B. Stofflisten mit

¹ Der Gemischerechner wurde von FoBiG im Auftrag des Arbeitskreises „Epoxidharz-Inhaltsstoffe“ (AK EIS) entwickelt. Er soll Formulierer und Anwender von Epoxidharzsystemen bei der Ermittlung weniger sensibilisierender Gemische unterstützen. Nach einer Registrierung ist die Nutzung für allen Interessenten frei (siehe <https://www.eis-epoximixrechner.de/willkommen/>).

wirkstärkendifferenzierenden Angaben) für die Stoffselektion/ -substitution in Epoxidharzsystemen bereitgestellt

2 FORSCHUNGSZWECK/-ZIEL

2.1 Hintergrund

2.1.1 Allergische Hauterkrankungen und Epoxidharzsysteme

Allergische Hauterkrankungen sind häufig bei Arbeitern aus verschiedenen Branchen, die gegenüber Epoxidharzsystemen exponiert sind, zu finden. Epoxidharzsysteme sind die häufigste Ursache der Allergischen Kontaktdermatitis (Aalto-Korte et al., 2020; Aalto-Korte et al., 2015; Schubert et al., 2020). Gemäß dem im Arbeitsschutz geltenden S-T-O-P-Prinzip² wurden in den vergangenen Jahren zahlreicher Verbesserungen in diesem Sinne erarbeitet und umgesetzt, z.B.:

- verbesserte Gebinde zur Vermeidung eines Hautkontaktes,
- Beschreibung der adäquaten Schutzausrüstung in Form von Handschuhen und Arbeitskleidung,
- Erarbeitung von Leitfäden zum sicheren Umgang mit Epoxidharzsystemen und
- ein verbessertes Schulungskonzept (siehe auch BG BAU³ und WINGIS⁴).

Allerdings zeigte sich dadurch bisher keine deutliche Verbesserung der Erkrankungshäufigkeit nach den vom Informationsverbund Dermatologischer Kliniken erhobenen Daten (siehe Abbildung 1).

² "S" wie Substitution (Ersatz, Auswechslung), "T" wie technische Maßnahmen, "O" wie organisatorische Maßnahmen und "P" wie personen- und verhaltensbezogene Sicherheitsmaßnahmen

³ <https://www.bgbau.de/themen/sicherheit-und-gesundheit/gefahrstoffe/umgang-mit-epoxidharzen/>

⁴ <https://www.wingisonline.de/GISCodes.aspx?codeid=23>

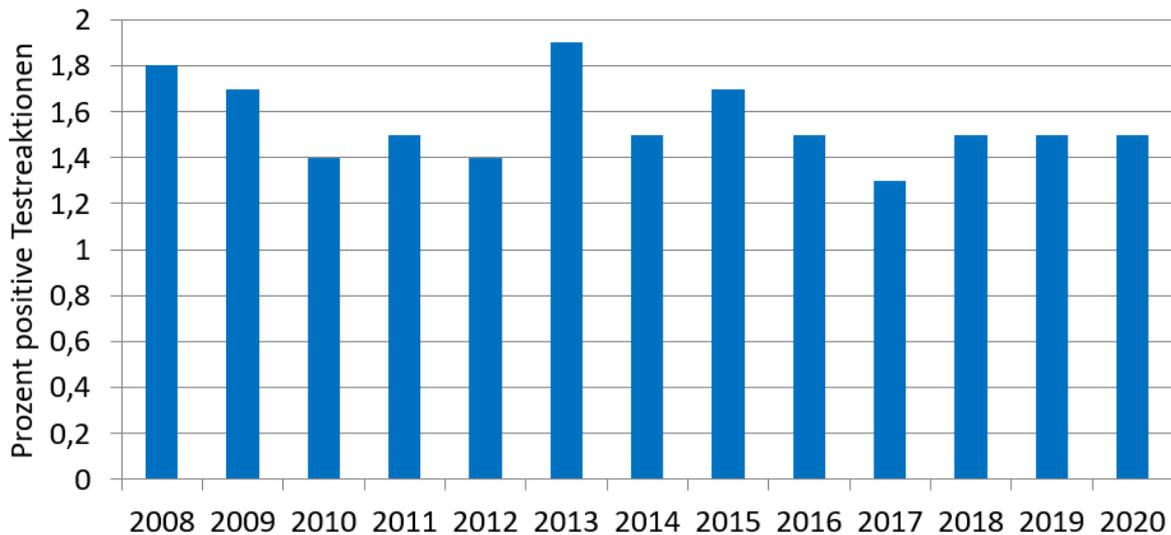


Abbildung 1 Informationsverbund Dermatologischer Kliniken, 2008 – 2020: Allergische Reaktionen auf Epoxidharz (DGEBA-Harz) alters- und geschlechtsstandardisierte Reaktionsquoten

Epoxidharz auf Basis von DGEBA (1% in Vaseline) ist Bestandteil der Standardreihe für die Epikutantestung der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (DKG). Diese Reihe wird bei (fast) jedem epikutan getesteten Patienten überprüft (im IVDK ca. 10.000 - 12.000 Patienten pro Jahr*). Es handelt sich also um ungezielte Testungen. * Coronabedingt in 2020 nur ca. 8.400 Patienten.

Obwohl es technisch in manchen Anwendungsbereichen keinen Ersatz für die Epoxidharze gibt, wird zunehmend Wert auf die Verbesserung der Zusammensetzung in Hinblick auf gesundheitliche Aspekte gelegt (falls technisch möglich). Hierzu ist die korrekte Identifikation von sensibilisierenden Inhaltsstoffen und die Bewertung deren sensibilisierender Wirkstärke notwendig (toxikologische Bewertung). Da nicht alle Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen die gleiche sensibilisierende Wirkstärke besitzen, kann die Substitution von stärker gefährdenden Stoffen durch weniger stark sensibilisierende Stoffe genutzt werden, um gesundheitlich verbesserte Systeme zu entwickeln. Eine Reduktion allergischer Hauterkrankungen ist entsprechend auf der toxikologischen Bewertung basiert (Corsini et al., 2018).

Die bessere Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke und die potentielle Ersetzbarkeit von stärker sensibilisierenden durch weniger stark sensibilisierende Inhaltsstoffe war bereits Gegenstand verschiedener, von der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV) geförderter Projekte (Heine et al., 2012; 2016). Die Projekte wurden zudem durch die DEUTSCHE BAUCHEMIE e.V. (Frankfurt am Main), durch PlasticsEurope (Brüssel), und durch die Allgemeine Unfallversicherungsanstalt (AUVA, Wien) finanziell unterstützt.

Gegenstand dieser Projekte waren:

- Entwicklung eines Rankingsystems für die Bewertung aller zu einem Stoff vorhandenen Ergebnisse (d.h. Humanbefunde, Ergebnisse aus Tierversuchen (In vivo), Ergebnisse aus dem Reagenzglas (In vitro) und Ergebnisse aus computergestützten Modellen (In silico).
- Erstellen einer Liste von sensibilisierenden Inhaltsstoffen aus Epoxidharzsystemen (heute „Allergenliste“). Die tatsächliche Relevanz dieser Stoffe wurde durch Vertreter aus Behörden, von Unfallversicherungsträgern und der Industrie bestätigt.

- Sichtung, Beschreibung und Bewertung aller zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen Methoden zur Erfassung der sensibilisierenden Eigenschaften und Potenz von Substanzen.
- Einordnung der sensibilisierenden Inhaltsstoffe der Allergenliste gemäß der entwickelten Rankingmethodik in mindestens zwei Wirkstärkekategorien – geringe und mäßige Wirkstärke (Kategorie GMS) versus hohe Wirkstärke (Kategorie HS). Eine dritte Kategorie wurde für Fälle, in denen die Datenlage für eine eindeutige Zuordnung nicht ausreichend war, erstellt (Kategorie U = unbekannt). Die Kategorie U wurde standardmäßig, wie ein Stoff der Kategorie HS für die weitere Verwendung bewertet.
- Bewertung möglicher Einflüsse anderer Substanzeigenschaften, wie z.B. Hautreizung, in Bezug auf die gesundheitliche Gefährdung.
- Entwicklung eines Online-Rechners („Gemischerechner“⁵), mit dessen Hilfe die sensibilisierenden Eigenschaften zweier (möglichst technisch vergleichbarer) Endprodukte verglichen werden. Als ein Eingangsparameter dient die ermittelte Wirkstärkekategorie der sensibilisierenden Inhaltsstoffe. Die Auswirkung einer Substitution wird so umgehend sichtbar.

Die Fortführung der Arbeiten (z.B. Aktualisierung der Allergenliste, Integration neuer Erkenntnisse zu Epoxidharz-Inhaltsstoffen, Optimierung des Gemischerechners) erfolgt im Arbeitskreis „Epoxidharz-Inhaltsstoffe“ (AK EIS). Der Arbeitskreis existiert seit 2017 und besteht aus Vertretern verschiedener Unfallversicherungsträger (UVT) und Verbänden (industriell). Der AK EIS wird inhaltlich unterstützt durch Arbeiten von FoBiG, sowie des Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK, angesiedelt als Institut an der Universität Göttingen, vertreten durch Herrn Prof. Dr. med. J. Geier).

2.1.2 Allergische Kontaktdermatitis – Mechanismen und Testmethoden

Die allergische Kontaktdermatitis („allergic contact dermatitis“, ACD) ist eine Erkrankung der Haut. Das klinische Erscheinungsbild ist das sogenannte Kontaktekzem, das typischerweise 24-48 Stunden nach Exposition gegenüber dem Kontaktallergen, z.B. Epoxidharz-Inhaltsstoffen, sichtbar wird. Voraussetzung ist, dass der Patient bei einem Erstkontakt gegenüber dem Allergen sensibilisiert worden ist. Es müssen also sowohl die 1. Phase der Sensibilisierung als auch die 2. Phase (Auslösephase) durchlaufen werden. Der symptomlose Zustand (Syndrom) wird als Kontakthypersensibilität bezeichnet (englisch: „contact allergy“, oder auch Reaktion verzögerter Typ, oder Typ IV).

Für die Sicherheitsbeurteilung eines Stoffes muss also geklärt werden, ob dieser die Eigenschaft besitzt nach Kontakt mit der Haut eine Sensibilisierungsreaktion auszulösen. Der Mechanismus der Hautsensibilisierung ist gut untersucht und im sogenannten „Advers outcome pathway“ (AOP) der OECD beschrieben (OECD, 2012a; b). Ein AOP beschreibt allgemein eine nötige Abfolge von Ereignissen („key events“, KEs), die eine Chemikalie auslösen muss, um zu einem bestimmten adversen Effekt zu führen. Dabei startet ein AOP immer mit einem auf molekularer Ebene initiiierendem Ereignis, dem sogenannten „molecular initiating event“ (MIE = KE1). Anschließend folgen Schlüsselereignisse (KEs) auf zellulärer, Organ- und Organismusebene. In Abbildung 2 findet sich ein Schema, welches den aktuellen Stand der Wissenschaft zur Entstehung einer Sensibilisierung in Form eines AOPs darstellt.

⁵ Nach einer Registrierung ist die Nutzung für allen Interessenten frei (siehe <https://www.eis-epoximixrechner.de/willkommen/>).

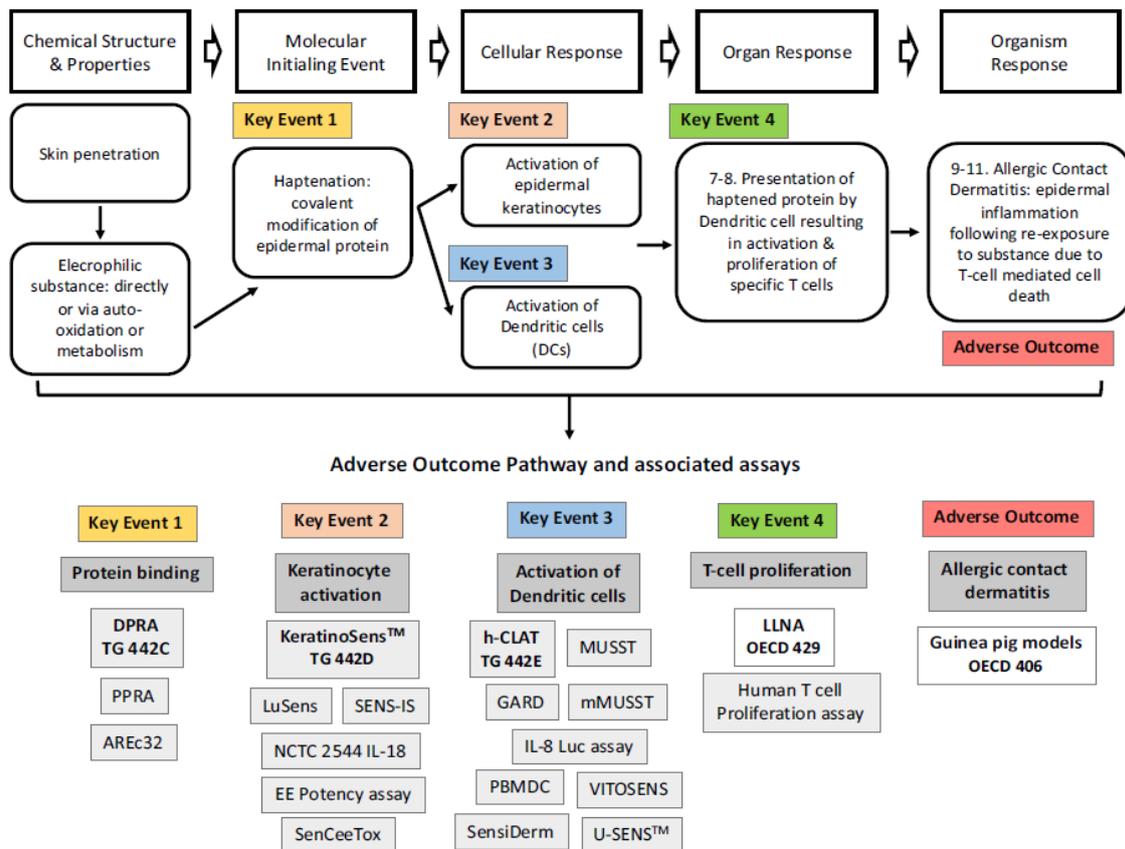


Abbildung 2 Flussdiagramm zum Ablauf der mechanistisch notwendigen Schritte (AOP) für die Entstehung einer Kontaktdermatitis und die existierenden *In-vitro*-Testsysteme (Abbildung entnommen aus Corsini et al., 2018)

Als KE definiert sind nach (OECD, 2012a; b) folgende vier Schritte:

- KE1 – Haptenisierung (Proteinreaktion),
- KE2 – Keratinozytenreaktion (Entzündungsmediatoren),
- KE3 – Reifung und Migration der dendritischen Zellen,
- KE4 – T–Zellaktivierung/ Proliferation allergenspezifischer T–Zellen.

Als Grundvoraussetzung für eine hautsensibilisierende Wirkung gilt, dass der Stoff die Haut bis hin zu den lebenden Zellschichten penetrieren kann.

Die Hautsensibilisierung ist bei der sicheren Handhabung, Verpackung und zum Transport von Chemikalien (z.B. EC, 2008 und deren Gesetzesnovellen) zu berücksichtigen.

Die Beurteilung der Hautsensibilisierung beinhaltet typischerweise Tierexperimente. Klassische Methoden sind der Magnusson-Kligman-Meerschweinchen-Maximierungstest (GPMT), der Bühler-Test (OECD, 1992, TG 406) und der lokale Lymphknotentest (LLNA) mittels radioaktiver und nicht radioaktiver Methodik (OECD, 2002, TG 429; 2010a ; 2010b; TG 442A / B)⁶. Der LLNA war als Alternativmethode zu den Meerschweinchentests entwickelt worden und verbesserte das Tierwohl nach den 3R-Prinzipien. Allerdings bestehen im Bereich der Chemikalien- und Wirkstofftestung weiterhin große ethische Bedenken gegenüber

⁶ Jeweils die 1.Fassung der Prüfrichtlinien, es können mittlerweile aktualisierte Fassungen vorliegen.

Tierversuchen, die gesetzliche Anpassungen nach sich zogen. So wurde beispielsweise durch die 7. Änderung⁷ der europäischen Kosmetikrichtlinie 76/768/EEC geregelt, dass ab 2013 der Einsatz von Tierversuchen zur Risikoabschätzung von Kosmetikinhaltstoffen gänzlich verboten ist. Und auch im Bereich der Chemikaliengesetzgebung stellen mittlerweile *In-vitro*-Tests die Standardanforderung für den Endpunkt Hautsensibilisierung dar (EC, 2016), von der nur im begründeten Ausnahmefall abgewichen werden darf.

Die wissenschaftliche Forschung hat sich also in den letzten zwei Jahrzehnten darauf konzentriert, Forschungsergebnisse der Hautsensibilisierung (siehe oben) zu nutzen, um Tierexperimente durch geeignete *In-vitro*-Testverfahren zu ersetzen (Corsini et al., 2018; Rossi und Ezendam, 2018). Modelle, die auf Basis des mechanistischen Verständnisses der Hautsensibilisierung entwickelt wurden, bildeten dabei meist eines der oben genannten Schlüsselereignisse (KE) ab. Es folgten Validierungsstudien zu diesen alternativen, mechanistischen *In-vitro*-Studien unter der Schirmherrschaft des Europäischen Zentrums für die Validierung von Alternativmethoden (ECVAM). Die früh validierten Methoden wie der „Direct Peptide Reactivity Assay“ (DPRA) zur Prüfung der Proteinreaktivität (KE1, OECD, 2015a, TG 442 C), der KeratinoSens™ zur Prüfung der Keratinozytenreaktion (KE2, OECD, 2015b, TG 442 D) und der „Human Cell Line Activation Test“ (h-CLAT) zur Prüfung der Reifung dendritischer Vorläuferzellen (KE3, OECD, 2016, TG 442 E) fokussierten zunächst auf die Erkennung der sensibilisierenden Eigenschaften eines Stoffes. Erst nach und nach wurde die **Wirkstärkenbewertung** als notwendiger Endpunkt der neuen *In-vitro*-Testungen erkannt. Neuere Methoden nutzen die Gen- und Proteinregulation als Biomarker und scheinen besonders geeignet für die Wirkstärkenbewertung (z.B. GARD, SensiDerm™, SENS-IS, SenCeeTox laut (Reisinger et al., 2015)).

Aktuelle Probleme und Entwicklungen werden im Folgenden kurz skizziert:

- Einzelne Methoden bilden jeweils nur Teilschritte der Sensibilisierung ab. Die bisherige Annahme, dass eine Integration der Daten aus unterschiedlichen Tests notwendig ist (siehe auch Vorgängerprojekte Heine et al., 2012; Heine et al., 2016), werden aktuell diskutiert (Natsch und Landsiedel, 2019; Roberts, 2018; 2019) und folgen dem Argument, dass das bestimmende Ereignis einer Sensibilisierung die Proteininteraktion ist. Dementsprechend müsste nur das 1. KE im quantitativen mechanistischen Modell geprüft werden, um bereits eine sehr hohe Prädiktivität (~80 %) zu erzielen (Benigni et al., 2015). Da alle drei validierten Testmethoden (DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT) die Proteininteraktion in gewissem Umfang modellieren, hängt der Nutzen der Verwendung von mehr als einem Assay davon ab, wie die verschiedenen Testmethoden die technischen Einschränkungen des anderen kompensieren (Roberts und Patlewicz, 2018).
- Die Vorhersagekraft der Testsysteme wurde meist mit den Ergebnissen aus dem Standard-Tierversuch (LLNA) verglichen. Aktuell werden vermehrt Datensätze mit Humandaten generiert und die *In-vitro*-Testsysteme daran gemessen (Hoffmann et al., 2018; Kleinstreuer et al., 2018).

⁷ Richtlinie 2003/15/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Februar 2003 zur Änderung der Richtlinie 76/768/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel

- Ein validiertes Modell zur Potenzbewertung fehlt, aktuell befinden sich der SENS-IS und GARD™ in der Validierungsphase bei ECVAM.⁸
- In letzter Zeit wurden dringend benötigte Weiterentwicklungen von *In-vitro*-Testmethoden zur Erfassung der sensibilisierenden Wirkung und Potenz erarbeitet. Dem entgegenstehen jedoch die langwierigen regulatorischen Validierungsprozesse. Um dieses Problem zu lösen, wird aktuell von der OECD (unter Schirmherrschaft von ICVAM (EU, USA, Kanada und JAPAN)) die 1. „Performance-based testing guideline“ für sogenannte definierte Vorgehensweisen der Dateninterpretation (DA, „defined approaches“) entwickelt (Casati et al., 2018; OECD, 2018a; b)⁹.

Im vorliegenden Projekt wurde die Analyse von verschiedenen Inhaltsstoffen aus Epoxidharzsystemen mit dem „Genomic Allergen Rapid Detection“-Test (GARD™skin und GARD™potency) durchgeführt.

2.2 Forschungsziel und Zielgruppe

1) Zielsetzung, Zielgruppen

Dieses Projekt verfolgt **das Ziel**, die wissenschaftlichen Grundlagen der Bewertung der hautsensibilisierenden Wirkstärke von Inhaltsstoffen in Epoxidharzsystemen durch experimentelle Ergebnisse aus *In-vitro*-Testungen der neuesten Generation zu erweitern, um zusätzliche Stoffe in ihrer hautsensibilisierenden Wirkstärke einordnen zu können und so einen besseren Schutz der Anwender zu gewährleisten.

Im AK EIS wurde als Vorarbeit zum Projekt ein Set an Einzelstoffen, Präpolymeren und Gemischen identifiziert, zu denen die notwendigen Daten für eine Wirkstärkenbewertung fehlen (siehe Tabelle 1). Ein Teil dieser Stoffe wurde nun im vorliegenden Projekt mittels GARD™skin auf ihre sensibilisierende Wirkung und anschließend mittels GARD™potency auf ihre sensibilisierenden Wirkstärke geprüft.

Das vorliegende Projekt zielt einerseits auf die **Schließung besonders wichtiger Datenlücken** bei der Bewertung von sensibilisierender Wirkstärke für Präpolymere, die (bei derzeit mangelhafter Datenlage) als erfolgsversprechende Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen zur Senkung der Allergiepotez diskutiert werden. Besonders zentral ist darüber hinaus die Prüfung, ob die **Testergebnisse Übertragungen** (generalisierbare Aussagen zur Wirkstärke) zulassen,

- a) **auf andere Präpolymere in Epoxidharzen** außer den getesteten Beispielsstoffen,
- b) darüber hinaus ggfs. **auf andere Anwendungen von Präpolymeren** im Vergleich zu entsprechenden Monomerkomponenten.

Letztlich sollen die erzielten Testergebnisse und generellen Regeln in entsprechende **praxisorientierte Entscheidungshilfen** (z.B. Stofflisten mit wirkstärken-differenzierenden Angaben) für die Stoffselektion/ -substitution umgesetzt werden.

⁸ Mittlerweile liegt die “ESAC Opinion on the Scientific Validity of the GARDskin and GARDpotency Test Methods. ESAC Opinion No. 2021-01 of 8 July 2021” vor. Eine Bewertung der darin gemachten Aussagen folgt in der Diskussion zum Gesamtvorhaben.

⁹ Mittlerweile wurde die entsprechende Prüfrichtlinie zur Anwendung von „defined approaches“ von der OECD veröffentlicht (OECD 497). Diese werden in der Diskussion zum Gesamtvorhaben besprochen.

Tabelle 1 Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen welche vom AK EIS als relevant für In-vitro-Testung befunden wurde (Gesamtliste)

Stoffname	CAS-Nr.	Testung finanziert von
Tetraethylenpentamin (TEPA)	112-57-2	DGUV FP-451
Bis (4-(1,2-bis(ethoxy - carbonyl) ethylamino)-3-methylcyclohexyl) methan	136210-32-7	Nicht getestet, da keine Finanzierung möglich
1,3-Cyclohexylen-bis-methylamin (1,3 BAC)	2579-20-6	Nicht getestet, da keine Finanzierung möglich
IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	-	DGUV FP-451
TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	-	DGUV FP-451
1,3 BAC- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	-	AK EIS Mitglieder
Polyamidoamin – Rest TETA < 1%	-	DGUV FP-451
Härter Gemisch 1*	-	AK EIS Mitglieder
Härter Gemisch 2**	-	AK EIS Mitglieder

Die grau hinterlegten Stoffe konnten auf Grund mangelnder Finanzierung nicht in die Reihentestung eingeschlossen werden. Die Testung der gelb hinterlegten Stoffe wurde durch Mitglieder aus dem AK EIS finanziert (in alphabetischer Reihenfolge: Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie (BG RCI); Deutsche Bauchemie e.V.; Epoxy Resins Committee (ERC) des Herstellerverbands PlasticsEurope).

BzOH: Benzylalkohol, IPD: Isophorondiamin, TETA: Triethylentetramin, 1,3 BAC: 1,3-Cyclohexylen-bis-methylamin

* Zusammensetzung: 50 % BzOH (CAS-Nr. 100-51-6); 5 % Salicylsäure (CAS-Nr. 69-72-7), 35 % IPD (CAS-Nr. 2855-13-2), 10 % MXDA (CAS-Nr. 1477-55-0); ** Zusammensetzung 50 % BzOH (CAS-Nr. 100-51-6); 5 % Salicylsäure (CAS-Nr. 69-72-7), 30 % TEPA (CAS-Nr. 112-57-2), 15 % Jeffamine D230 (CAS-Nr. 9046-10-0)

Zielgruppe für dieses Projekt sind vor allem:

- Produktentwickler von Epoxidharzsystemen und
- Berufsgenossenschaften, die anhand einer verbesserten Bewertungsmöglichkeit der Exposition verbesserte Handhabungen und eventuell Substitutionsempfehlungen ableiten könnten.

3 METHODIK

Im folgenden Kapitel wird die angewandte Testmethode zunächst im Prinzip erklärt, anschließend die konkrete Testdurchführung erläutert und die hier verwendeten Testmaterialien im Detail beschrieben.

3.1 Testmethode – GARD™

3.1.1 Allgemein

Der **Genomic Allergen Rapid Detection (GARD™)** ist ein *In-vitro*-Test zur Vorhersage der sensibilisierenden Eigenschaften (GARD™skin) und Wirkstärke (GARD™potency) von Chemikalien (Albrekt et al., 2014; Johansson et al., 2013; Johansson und Gradin, 2017; Johansson et al., 2011). Der Test wird im Zuge neuer und relevanter Entwicklungen im Bereich der *In-vitro*-Testung genannt (Corsini et al., 2018; Johansson et al., 2017; Reisinger et al., 2015). Die Vorhersage des GARD™skin beruht auf der Analyse der relativen Expression einer Biomarkersignatur von 196 Genen unter Verwendung einer humanen myeloischen Leukämie-Zelllinie (sog. SenzaCell, welche ein Subclon der MUTZ-3 Zelllinie ist). Im GARD™potency sind es 51 Gene. Der GARD™ basiert auf der chemischen Stimulation der SenzaCell-Linie, die als *In-vitro*-Modell menschlicher dendritischer Zellen (DCs, KE3) dient. Die Auswertung des Tests beruht auf der Quantifizierung der genomischen Prädiktoren (in Form von RNA), die zusammen als GARD™ Prediction Signature (GPS) bezeichnet werden. Dies wird unter Verwendung der Nanostring nCounter-Technologie durchgeführt. Die weitere Auswertung erfolgt ebenfalls computer-gestützt. Die Vorhersage einer Substanz, als sensibilisierend oder nicht-sensibilisierend, basiert auf einem abgeleiteten Entscheidungswert („decision value“, DV) aus einem „Support Vector Machine“ (SVM)-Modell (ein maschinelles Lernverfahren). Der Algorithmus des Modells verwendet bekannte Datensätze aus bereits durchgeführten Zellstimulationen mit bekannten Chemikalien aus dem Trainingsset. Mit diesem Datensatz wird für jede neue Probe ein DV erstellt. Für die Einordnung des Testergebnisses wird der Mittelwert des DV herangezogen. Wird eine Testsubstanz als sensibilisierend bewertet, kann die Wirkstärke der Substanz mit einer zusätzlichen GPS ermittelt werden. Eine Einordnung in die Wirkstärkekategorien 1A und 1B nach CLP (EU, 2008) ist möglich (Zeller et al., 2017).

Der GARD™ wurde als alleiniger (Stand-Alone-Test) Ersatz von Tierversuchen vorgeschlagen (Johansson und Gradin, 2017; Roberts, 2018). Die wissenschaftliche Diskussion, ob ein Test allein als Ersatz für den *In-vivo*-Versuch genügt ist noch im Gang (Natsch und Landsiedel, 2019; Roberts, 2019), ist aber für die Anwendung des Tests im vorliegenden Projekt nicht einschränkend.

Zwischenzeitlich wurde die Validierungsstudien durchgeführt und bei der zuständigen Gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Kommission („Joint Research Centre“, JRC) eingereicht und vom Referenzlabor der Europäischen Union für Alternativen zu Tierversuchen („European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing“, EURL ECVAM) bewertet. Vor Kurzem erschien die entsprechende Stellungnahme des EURL ECVAM wissenschaftlichen Beratungsausschuss („EURL ECVAM scientific advisory committee“, ESAC) in der die Validierungsstudie bewertet und eine Empfehlung an das OECD Komitee für Prüfrichtlinien gegeben wurde (Corsini et al., 2021; weitere Details siehe 4.2.1).

3.1.2 Testdurchführung

Die detaillierte Testdurchführung wird in den Originalstudienberichten (siehe Anhang) für die jeweiligen Stoffe beschrieben. Grundsätzlich sind folgende Schritte notwendig:

1. Zunächst erfolgen **Löslichkeitsversuche** mit den Testmaterialien in üblichen Lösemitteln für zellbasierte In-vitro-Versuche. Die erste Wahl stellen Dimethylsulfoxid (DMSO, CAS-Nr. 67-68-5) oder Wasser dar. Es wird bis zu einer maximalen Konzentration von 500 mM getestet (Stocklösung, siehe Tabelle 4).
2. Anschließend erfolgt eine 1:100 Verdünnung dieser Stocklösung in DMSO im Zellkulturmedium (sogenannter Workingstock, siehe Tabelle 4). Sollte ein Testmaterial hier nicht löslich sein, werden weitere Verdünnungen der Stocklösung ins Zellkulturmedium gebracht bis entweder eine Lösung oder zumindest eine stabile Suspension vorliegt (keine Präzipitate). In-vitro-Testungen mit stabilen Suspensionen liefern laut verschiedener zellbasierter OECD-Prüfrichtlinien ebenfalls verlässliche Resultate (OECD, 2015b; 2016).¹⁰
3. In einem weiteren Vortest wird nun die **Zytotoxizität** der Testmaterialien bestimmt (sog. Input Finder Assay). Hierzu wird die Workingstocklösung in einer 1:10 Verdünnung auf die vorbereiteten Zellen (SenzaCells) gebracht und für 24 h unter den entsprechenden Zellkulturbedingungen inkubiert. Eine Verdünnungsreihe wird angesetzt, um die Konzentration zu bestimmen bei der eine relative Lebensfähigkeit von 90 % ± 5 % (RV90) gefunden wird (= „GARD input concentration“). Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung werden die Zellen nach der Inkubation mit Propidiumiodid (einem Marker für Zytotoxizität) gefärbt und mittels durchflusszytometrischer Methoden (FACS) analysiert. Die RV90 wird relativ zur Zellkulturmediumkontrolle bestimmt.
4. Nun erfolgt die **Hauptstimulation der Zellen**. Diese wird mit nur **einer Konzentration** (siehe oben) durchgeführt und ist entsprechend der Situation aus dem Input Finder Assay für das jeweilige Testmaterial gemäß den folgenden Möglichkeiten zu wählen:
 - a. Zytotoxische Verbindungen: Konzentration, die 90 % ± 5 % relative Lebensfähigkeit (RV90) ergibt
 - b. Nicht zytotoxische und lösliche Verbindungen: maximal zu verwendende Konzentration 500 µM
 - c. Nicht zytotoxische und unlösliche Verbindungen: höchste lösliche Konzentration

Im Hauptversuch werden die vorbereiteten Zellen ebenfalls für 24 h unter den entsprechenden Zellkulturbedingungen inkubiert. Als Kontrollen werden jeweils eine Kontrolle mit nur Zellkulturmedium und eine Kontrolle mit dem verwendeten Lösemittel (hier DMSO finale Konzentration von 0,1 %) mitgeführt. Als Positivkontrolle dient p-Phenylendiamine (PPD; CAS-Nr. 106-50-3 mit 50 µM und einer finale DMSO Konzentration von 0,1 %). Nach der Inkubation werden die behandelten Zellen aufgeteilt für die Zytotoxizitätskontrolle und die RNA-Isolation. Zunächst wird die Zytotoxizität (wie oben beschrieben mittels FACS) kontrolliert (Duplikat). Werden die geltenden Qualitätsanforderungen an die Zytotoxizität für einen validen Test erfüllt (siehe Abschnitt 8.2 in den Originalstudienberichten), wird die RNA aus den

¹⁰ in der jeweils aktuellen Fassung

entsprechend vorbereiteten TRIzol Proben isoliert und bei -80°C an das Labor zur Aufarbeitung der RNA (SenzaGen AB) verschickt (Triplikat).

5. Im Analyselabor wurde die Qualität der RNA-Proben geprüft und die weitere Verarbeitung für die Nanostring-Messung durchgeführt. Die Proben wurden mittels nCounter Digital Analyser (Nanostring-Technologie) analysiert und die Rohdaten mit Hilfe der „GARD Data Analysis Application“ (GDAA) ausgewertet. Dabei gelten die folgenden Regeln:

GARD™skin (Analyse von 196 Genen in der GPS) - Definition des Auswertemodells:

- Wenn der mittlere Entscheidungswert (DV) der biologischen Wiederholungsproben ≥ 0 ist, wird die Substanz als sensibilisierend eingestuft.
- Wenn der mittlere Entscheidungswert (DV) der biologischen Wiederholungsproben < 0 ist, wird die Substanz als nicht sensibilisierend eingestuft.

GARD™potency (Analyse von 51 Genen in der GPS) - Definition des Auswertemodells:

- Wenn der mittlere Entscheidungswert (DV) der biologischen Wiederholungsproben ≥ 0 ist, wird die Substanz in die Unterkategorie 1A eingestuft.
- Wenn der mittlere Entscheidungswert (DV) der biologischen Wiederholungsproben < 0 ist, wird die Substanz Stoff in die Unterkategorie 1B eingestuft.

3.2 Testmaterialien

Die Testmaterialien wurden von Mitgliedern des AK EIS für die Testung in diesem Forschungsvorhaben unentgeltlich zur Verfügung gestellt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 Testmaterialien, der Reihentestung im GARD™ bei der Eurofins BPT Munich GmbH

Stoffname	CAS-Nr.	Zur Verfügung gestellt von
Tetraethylenpentamin (TEPA; DBC-20-A1)	112-57-2	MC Bauchemie
IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (DBC-20-B4)	-	MC Bauchemie
TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (DBC-20-C5)	-	MC Bauchemie
1,3 BAC- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (DBC-20-D6)	-	MC Bauchemie
Polyamidoamin – Rest TETA < 1% (Epamide 405)	-	Stauf Gahlmann
Härter Gemisch 1*	-	MC Bauchemie
Härter Gemisch 2**	-	MC Bauchemie

* 50 % BzOH (CAS-Nr. 100-51-6); 5 % Salicylsäure (CAS-Nr. 69-72-7), 35 % IPD (CAS-Nr. 2855-13-2), 10 % MXDA (CAS-Nr. 1477-55-0); ** 50 % BzOH (CAS-Nr. 100-51-6); 5 % Salicylsäure (CAS-Nr. 69-72-7), 30 % TEPA (CAS-Nr. 112-57-2), 15 % Jeffamine D230 (CAS-Nr. 9046-10-0)

Es handelt sich dabei um:

- i) einen Einzelstoff,
- ii) drei Präpolymere (jeweils eine Art Gemisch auf Basis DGEBA),
- iii) ein Polyamidoamin (Art von Gemisch auf Basis C18-ungesättigter Dimer-Fettsäuren), und
- iv) um zwei definierte Gemische (graue Schrift), die jeweils als Beispiel für die Härterkomponente eines theoretischen Epoxidharzproduktes steht (nicht weiter relevant für das vorliegende Forschungsvorhaben).

Die Spezifikationen der Testmaterialien wurden dem Labor von den jeweiligen bereitstellenden Institutionen mitgeteilt und sind für die im vorliegenden Forschungsvorhaben relevanten Inhaltsstoffe (d.h. i, ii und iii von oben) in Tabelle 3 näher definiert.

Alle Testmaterialien werden dabei für die Testdurchführung als hochrein (nahe 100 %) angesehen. Die Angabe des Molekulargewichts ist, außer beim definierten Einzelstoff (TEPA), nicht trivial. Es wurde entschieden, dass für die Gemische das nach Anteilen gewichtete Mittel aller Bestandteile herangezogen wird. Für die Präpolymere und beim Polyamidoamin wurde hierzu das jeweils geschätzte mittlere Gewicht der polymeren Struktur verwendet. Das Mittel liegt circa bei 1000 g/mol, mit Unter- und Obergrenzen zwischen 660 bis 3500 g/mol.

Tabelle 3 Zusammensetzung und Molekulargewicht der für dieses Forschungsvorhaben relevanten Testmaterialien

Stoffname	Reinheit / Zusammensetzung	Oberes Molekulargewicht [g/mol]	Gewichtetes mittleres MW gesamt [g/mol]
Tetraethylen-pentamin (TEPA)	> 99 %	189,3	
IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	30 % Polymer Amin-terminiert, ca. 30,8 % IPD, 39,2 % BzOH	3000 nur Polymeranteil	394,7
TEPA-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	30 % Polymer Amin-terminiert, ca. 30,8 % TEPA, 39,2 % BzOH	3000 nur Polymeranteil	400,7
1,3 BAC-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	30 % Polymer Amin-terminiert, ca. 30,8 % 1,3 BAC, 39,2 % BzOH	3000 nur Polymeranteil	386,2
Polyamidoamin – Rest TETA < 1% *	30-50 % Oligomer TOFA mit TEPA und TETA, 30-50 % Oligomer TOFA mit TETA, <1 % TETA, <1 % TEPA		1050 (Bereich 1040 bis 1160)

*Polyamid auf Basis C18-ungesättigter Dimer-Fettsäuren (TOFA-Dimer) und Triethylentetramin und Tetraethylenpentamin. Oligomeren-Mischung TOFA mit TEPA und TETA (CAS 68071-65-8); Oligomeren-Mischung TOFA mit TETA (CAS 68082-29-1); TETA (CAS 90640-67-8); TEPA (CAS 112-57-2)

4 ERGEBNISSE DER IN-VITRO-TESTUNG

Im ersten Teil (siehe 4.1) werden die Ergebnisse für die Testung der sensibilisierenden Wirkung und Wirkstärke sowie die Zwischenergebnisse zur Löslichkeit und Zytotoxizität beschrieben.

Im zweiten Teil (siehe 4.2) erfolgt die Diskussion zur Eignung der GARD™ Testmethode generell und speziell für die hier untersuchten Stoffe, mögliche identifizierte Probleme in Bezug auf Löslichkeit, Zytotoxizität, die Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke. Generelle Probleme von In-Vitro-Testmethoden werden betrachtet und die Ergebnisse interpretiert im Kontext der bereits vorhandenen Daten zu Präpolymeren aus Vorgängerprojekten und aus der Industrie. Hier erfolgt die Ableitung generell gültiger Regeln für DGEBA-basierte Präpolymere und die Diskussion der praktischen Umsetzbarkeit.

4.1 Daten und Auswertung

In Tabelle 4 sind die (Zwischen-)Ergebnisse der durchgeführten Testung zusammengefasst. Es werden pro Testmaterial die dazugehörige Eurofins BPT Munich GmbH Studiennummer für die Wiederfindung des Originalstudienberichts im Anhang gelistet, die Ergebnisse für die Vorversuche zur Löslichkeit (Stocklösung im Lösungsmittel und Löslichkeit im Zellkulturmedium (Workingstock)) und Zytotoxizität und das jeweilige Ergebnis des GARD™skin und des GARD™potency. Es wird dabei auf die unterschiedliche Möglichkeit der Auswertung unter Einbezug verschiedener Molekulargewichtsannahmen eingegangen. Das Molekulargewicht kann bei der Auswertung in unterschiedlicher Weise einbezogen werden und hat relevanten Einfluss auf das Ergebnis. Eine entsprechende Diskussion zu einem angemessenen Umgang mit dem Molekulargewicht erfolgt in Abschnitt 4.2.4. Das Ergebnis für die Wirkstärkeermittlung im GARD™potency mit den unterschiedlichen Auswertungsmodellen wird ausgewiesen (Modell 1: „Support Vector Machine“ (SVM) basierend auf 51 genomischen Biomarkern; Modell 2: SVM basierend auf 51 genomischen Biomarkern UND der GARD input concentration, d.h. abhängig vom Molekulargewicht; für die Testvalidierung wurde das Modell 2 gewählt (Gradin et al., 2020)). Diese Vorgehensweise wurde nach Diskussion mit dem Labor für die hier vorgesehene spezifische Auswertung im vorliegenden Fall festgelegt. Bei mehreren Ergebnissen wurden die fett gedruckten Werte für die weitere Auswertung herangezogen.

Daten für die zwei Härtergemische, die nicht im Fokus des aktuellen Forschungsvorhabens stehen, sind der Vollständigkeit wegen ebenfalls aufgeführt jedoch zur Kenntlichmachung in grauer Schrift.

Tabelle 4 Übersicht der Ergebnisse der Reihentestung im GARD™ bei der Eurofins BPT Munich GmbH

Stoffname	Studien-nummer ¹¹	Molekular-gewicht (MW) [g/mol]	Stocklösung im Lösungsmittel [mM]	Löslichkeit im Zellkulturmedium (Workingstock)	Input finder [µM]	RV90 im Haupt-versuch [µM]	GARD™ skin Ergebnis DV > 0 non-sensitizer DV < 0 sensitizer	GARD™ potency Ergebnis Model 2	GARD™ potency Ergebnis Nicht validiertes Model 1 ¹²
Tetraethylen-pentamin (TEPA)	STUGC 20AA1280-3	Fix MW 189,3	456.7	Lösung	457	457 Nicht zytotoxisch	DV = 0.003 Sensitizer	DV = -4,15 1B	DV = -2,49 1B
IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (30% polymer amine terminated, ca. 30,8 IPD, 39,2% BzOH)	STUGC 20AA1280-4	Upper MW 3000	207 ¹³	Stabile Suspension	8	5 HV1 7 HV2 + HV3	DV = 7.79 Sensitizer	DV = 4,96 1A	DV = 5,06 1A
		Lower MW 700	887.1		36	23 HV1 29 HV2 + HV3		DV = 4,88 1A	
		Gewichtetes mittleres MW¹⁴ 394,7	1573.2		64	41 HV1 52 HV2 + HV3		DV = 4.80 1A	
		MW Amin-Monomers IPD: 170,3	3646.3		148	94 HV1 121 HV2 + HV3		DV = 4,55 1A	
TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (Ca. 30% polymer amine terminated, ca.	STUGC 20AA1280-2	Upper MW 3500	188.7	Lösung	19/18**	26 HV1 30 HV2 + HV3	DV = 0.804 Sensitizer	DV = 0,283 1A	DV = -1,63 1B
		Lower MW: 750	880.6		88/84**	120 HV1 140 HV2 + HV3		DV = -0.055 1B	

¹¹ Als Referenz für die Originalstudienberichte (siehe Anhang)

¹² Unabhängig vom MW

¹³ Maximal mögliche Konzentration, da limitierte Löslichkeit

¹⁴ Wie folgt berechnet unter Annahme des mittleren MW des Polymers von 1000 g/mol: gewichtetes mittleres MW = 0,3*1000 + 0,308*170,3 + 0,392*108,1 = 394,7 g/mol

Stoffname	Studiennummer ¹¹	Molekulargewicht (MW) [g/mol]	Stocklösung im Lösungsmittel [mM]	Löslichkeit im Zellkulturmedium (Workingstock)	Input finder [µM]	RV90 im Hauptversuch [µM]	GARD™ skin Ergebnis DV > 0 non-sensitizer DV < 0 sensitizer	GARD™ potency Ergebnis Model 2	GARD™ potency Ergebnis Nicht validiertes Model 1 ¹²
30,8 TEPA, 39,2% BzOH)		Gewichtetes mittleres MW: 400.7	1648.2		165/158**	225 HV1 262 HV2 + HV3		DV = -0.433 1B	
		MW Amin-Monomers 189.3	3488.9		349/334**	476 HV1 556 HV2 + HV3		DV = -1,37* 1B	
1,3 BAC-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (Ca. 30% polymer amine terminated, ca. 30,8 1,3-BAC, 39,2% BzOH)	STUGC 20AA1280-6	Upper MW 2800	215.3 ¹⁵	Stabile Suspension	7	7 HV1 9 HV2 + HV3	DV = 11.90 Sensitizer	DV = 6,79 1A	DV = 7,37 1A
		Lower MW: 660	913.6		30	31 HV1 36 HV2 + HV3		DV = 6,69 1A	
		Gewichtetes mittleres MW: 386.2	1561,2		52	53 HV1 62 HV2 + HV3		DV = 6.60 1A	
		MW Amin-Monomers 142,2	4240,1		140	143 HV1 168 HV2 + HV3		DV = 6,22 1A	
Polyamidoamin – Rest TETA < 1%	STUGC 20AA1280-5	Mittleres MW: 1050	321.7 ¹⁶	Stabile Suspension	6	7 HV1 8 HV2 + HV3	DV = 3.23 Sensitizer	DV = -0,001 1B	DV = -0,723 1B
Härter Gemisch 1	STUGC 20AA1280-7	Gewichtetes mittleres MW: 134,2	470.3	Lösung	470	470 Nicht zytotoxisch	DV = 2.40 Sensitizer	DV = -3,28 1B	DV = -2,72 1B

¹⁵ Maximal mögliche Konzentration, da limitierte Löslichkeit

*Hier wurden zwei Mal Werte über 500 mM in die Auswertung eingegeben. Das wurde von der Auswerte App kommentiert, dass die App nur Konzentrationen bis 500 mM vorsieht. Berechnung wurde trotzdem durchgeführt. ** Erster Wert bezieht sich auf Input 1 und zweiter Wert bezieht sich auf Input 2

¹⁶ Maximal mögliche Konzentration, da limitierte Löslichkeit

Stoffname	Studiennummer ¹¹	Molekulargewicht (MW) [g/mol]	Stocklösung im Lösungsmittel [mM]	Löslichkeit im Zellkulturmedium (Workingstock)	Input finder [µM]	RV90 im Hauptversuch [µM]	GARD™ skin Ergebnis DV > 0 non-sensitizer DV < 0 sensitizer	GARD™ potency Ergebnis Ergebnis Model 2	GARD™ potency Ergebnis Nicht validiertes Model 1 ¹²
Härter Gemisch 2	STUGC 20AA1280-8	Gewichtetes mittleres MW: 153,6	466.4	Lösung	466	466 Nicht zytotoxisch	DV = -2.03 non-sensitizer	non-sensitizer	-

4.1.1 Löslichkeit

Alle Testmaterialien wurden in DMSO gelöst. Gemäß dem Vorgehen der Standardanweisung ist dies das bestgeeignete Lösemittel. DMSO selbst ist für lebende Zellen zytotoxisch und deswegen für die zellbasierten Tests im Zellkulturmedium maximal bis zu 1 % zulässig.

Im nächsten Schritt wurde die sogenannte Workingstocklösung im Zellkulturmedium angesetzt. Hier waren das TEPA und das TEPA-Präpolymer löslich bei der 1:100 Verdünnung im Zellkulturmedium und die anderen Präpolymere und das Polyamidoamin fielen aus (Präzipitate). Für diese drei Testmaterialien wurden weitere Verdünnungen der Stocklösung hergestellt (in DMSO bis hin zu 100 bzw. 75 mM) welche dann im Zellkulturmedium stabile Suspensionen¹⁷ bildeten (1 bzw. 0,75 mM in Medium). Wie bereits unter 3.1.2 erwähnt wird die Testung stabiler Suspensionen in zellbasierten Assays als valide eingeordnet. Entsprechend wurde mit diesen Konzentrationen zum nächsten Schritt – der Zytotoxizitätsmessung – übergegangen.

4.1.2 Zytotoxizität – GARD Input Finder Assay

Nur der Einzelstoff, das TEPA war nicht zytotoxisch und wurde entsprechend in der höchsten zu testenden Konzentration von 500 µM eingesetzt (Anmerkung: die tatsächliche Konzentration war durch einen Fehler bei der Einwaage im Test leicht unter dieser Maximalkonzentration und lag bei 457 µM. Dies wird jedoch nicht als kritisch für die Studiendurchführung und -auswertung angesehen.).

Die vier weiteren Testmaterialien zeigten deutliche zytotoxische Wirkung auf das zelluläre Testsystem (mit RV90-Werten im unteren µM-Bereich). Da bei allen dieser Stoffe eine sehr steile Dosis-Wirkungskurve beobachtet wurde (< Faktor 2 mit Sprüngen in der RV von 0 % hin zu >40 oder teilweise sogar > 80 % lebenden Zellen). Aus diesem Grund wurden die anschließenden Hauptstimulationen mit einem kleinen Verdünnungsbereich durchgeführt, anstelle von nur einer Konzentration. Damit wurde sichergestellt, dass eine relative Lebensfähigkeit von 90 % lebender Zellen reproduzierbar ist, da das biologische System (SenzaCell) variabel ist.

Die im Hauptversuch eingesetzten Konzentrationen lagen letztlich alle in einem Bereich, in denen die Testmaterialien im Medium gelöst waren, es war keine Trübung mehr zu beobachten und es lagen keine Präzipitate vor. Insofern ist das Ergebnis der Gensignaturmessung von Löslichkeitsproblemen unberührt.

4.1.3 Sensibilisierende Wirkstärke

Aus der hier durchgeführten Reihentestung im GARD™skin und GARD™potency an einem Einzelstoff, drei Präpolymeren und einem Polyamidoamin ergibt sich die in Tabelle 5 angegebene Einordnung gemäß der in der CLP-VO genannten Klassen für die sensibilisierende Wirkstärke.

¹⁷ Trübung sichtbar, jedoch auch nach längerem Stehen kein Absetzen von Präzipitaten

Tabelle 5 Ergebnis laut GARD™potency für sensibilisierende Wirkstärke gemäß der CLP-VO

Stoffname	Einstufung laut GARD™potency Ergebnis aus diesem FP-451 gemäß CLP-VO
Tetraethylenpentamin (TEPA)	Skin Sens 1B
TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (Ca. 30% polymer amine terminated, ca. 30,8 TEPA, 39,2% BzOH)	Skin Sens 1B
1,3 BAC- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (Ca. 30% polymer amine terminated, ca. 30,8 1,3-BAC, 39,2% BzOH)	Skin Sens 1A
IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (30% polymer amine terminated, ca. 30,8 IPD, 39,2% BzOH)	Skin Sens 1A
Polyamidoamin – Rest TETA < 1%	Skin Sens 1B

Aus den unter 4.1.1 unter 4.1.2 gemachten Beobachtungen der einzelnen Experimente lässt sich zunächst ableiten, dass die experimentellen Ergebnisse aus dem GARD™skin und GARD™potency als valide zu betrachten sind.

Drei Testmaterialien werden der Kategorie Skin Sens. 1B zugeordnet und somit als Stoffe mit geringer sensibilisierender Potenz betrachtet. Dies trifft auf die folgenden Testmaterialien zu:

- TEPA (monomeres Amin)
- TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH und
- Polyamidoamin (Epamide 405, < 2 % freies Amin) bestimmt.

Wohingegen zwei Testmaterialien in die Kategorie Skin Sens. 1A eingeordnet wurden. Dies sind:

- 1,3 BAC- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH und
- IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH.

Dies scheint zunächst unerwartet, da die Reaktivität gegenüber klassischen Härtern (den freien Aminen) in den Präpolymeren reduziert ist, da weniger freie Amingruppen vorliegen. Allerdings ist anzumerken, dass es sich sowohl bei IPD (durch Daten gesichert) als auch bei 1,3-BAC (mit nur wenigen Daten belegt), um stark sensibilisierende Monomere handelt. Es scheint, dass der noch frei vorliegende Anteil (leicht über 30 %) im Test ausreichend ist, um ein Ergebnis zu induzieren, dass die hohe sensibilisierende Wirkstärke des Amins wiedergibt.

Anmerkung: Die Ergebnisse für die nicht detailliert diskutierten Härter-Gemische liefern die theoretisch erwartete Differenzierung laut Gemischerechner und geben somit eine Bestätigung der theoretischen Grundlage des Gemischerechners („proof-of-concept“).

4.2 Diskussion In-Vitro-Testung und praktische Anwendung der Ergebnisse

Für die Diskussion sind in Tabelle 6 nochmals die in diesem Projekt ermittelte Wirkstärken laut GARD™, die Einstufung für diskussionsrelevanter Endpunkte, die Wirkstärke laut GARD™ aus der Validierungsstudie oder dem Trainingsset (Gradin et al., 2020; Johansson et al., 2019) und

die Einordnung der sensibilisierenden Wirkstärke (EIS-Liste) aus früheren DGUV-geförderten Projekten (Heine et al., 2012; 2016) aufgeführt, falls vorhanden. Neben den im vorliegenden Projekt getesteten Materialien sind dabei noch andere Epoxidharz-Inhaltsstoffe aufgeführt, z.B. das Lösemittel Benzylalkohol, sowie die monomeren Amine, welche für die Präpolymere verwendet wurden.

Tabelle 6 Sensibilisierende Wirkstärke und andere Eigenschaften für ausgewählte Epoxidharz-Inhaltsstoffe

Stoffname	CAS-Nr.	Skin Sens Kat. GARD™potency FP-451	Relevante Einstufung nach C&L Inventory bzw. SDS	Skin Sens Kat. GARD™potency Training	EIS-Liste*
Tetraethylenpentamin (TEPA)	112-57-2	Skin Sens 1B	H317 Skin Sens 1 H314 Skin Corr 1B	-	GMS (≈ Skin Sens 1B, mit Daten belegt)
TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (Ca. 30% polymer amine terminated, ca. 30,8 TEPA, 39,2% BzOH)		Skin Sens 1B	-	-	
1,3 BAC- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (Ca. 30% polymer amine terminated, ca. 30,8 1,3-BAC, 39,2% BzOH)		Skin Sens 1A	-	-	
IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (30% polymer amine terminated, ca. 30,8 IPD, 39,2% BzOH)		Skin Sens 1A	-	-	
Polyamidoamin – Rest TETA < 1%		Skin Sens 1B	H317 Skin Sens 1 H318 Eye damage 1 H315 Skin Irrit 2	-	
Benzylalkohol (BzOH)	100-51-6	-	(H317 Skin Sens 1B) H319 Eye Irrit 2	-	-
Isophorondiamin (IPD; 3-Aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylamin)	2855-13-2	-	H317 Skin Sens 1A H314 Skin Corr 1B H318 Eye damage 1	-	HS (≈ Skin Sens 1A, mit Daten belegt)
1,3-Bis-aminomethylcyclohexan (1,3-BAC)	2579-20-6	-	H314 Skin Corr 1A H318 Eye damage 1	-	HS (≈ Skin Sens 1A, ABER nur ein Test und negatives Ergebnis)
Bisphenol A-diglycidylether (MW340)	1675-54-3	-	H317 Skin Sens 1 H315 Skin Irrit 2 H319 Eye Irrit 2	Skin Sens 1A	HS (≈ Skin Sens 1A, mit Daten belegt)
Butyl-glycidylether	2426-08-6	-	H317 Skin Sens 1 H315 Skin Irrit 2 H319 Eye Irrit 2	Skin Sens 1B	GMS (≈ Skin Sens 1B, mit Daten belegt)
Ethylendiamin (EDA)	107-15-3	-	H317 Skin Sens 1B H334 Resp Sens 1B H314 Skin Corr 1B	Skin Sens 1B	HS (≈ Skin Sens 1A, mit Tierdaten belegt)**

GMS: geringe bis mäßige sensibilisierende Wirkstärke HS: hohe sensibilisierende Wirkstärke; dies sind die sensibilisierenden Wirkstärkekategorien aus vorangegangenen Projekten (siehe Heine et al., 2016);

* <https://www.dguv.de/ifa/praxishilfen/praxishilfen-gefahrstoffe/epoxidharze/bewertung-der-inhaltsstoffe-e-i-s/index.jsp>;

** Bei der Bewertung des EDA spielen metabolische Aktivität des Testsystems, ob EDA oder EDA-dihydrochlorid getestet wurde und das verwendete Vehikel eine entscheidende Rolle. Eine ausführliche Diskussion findet sich in (Heine et al., 2012), entsprechend bleibt die Bewertung der EIS-Liste bestehen, auch wenn EDA von der Industrie als Skin Sens 1B geführt wird.

4.2.1 Generelle Eignung der GARD™-Testmethode

Wie bereits eingangs erwähnt wurden die Validierungsstudien beim JRC eingereicht und kürzlich erschien die offizielle Stellungnahme des entsprechenden Expertengremiums (Corsini et al., 2021).

Hauptkritik der Experten an der durchgeführten Validierungsstudie ist die Verwendung einer großen Anzahl an Chemikalien, welche bereits als Trainingsset zur Etablierung der Testmethode und speziell des maschinellen Algorithmus zur Auswertung (SVM) verwendet wurden, und nun ebenfalls für die multizentrische Validierungsstudie¹⁸. Die unabhängigen Experten sehen darin die Möglichkeit der Überanpassung (sog. „overfitting“) des Modells. Speziell für den GARD™potency wird außerdem noch auf die insgesamt eher niedrige Anzahl der getesteten Chemikalien, insbesondere der nicht sensibilisierenden Stoffe, hingewiesen, die eine gewisse Unsicherheit für die Bewertung birgt.

Grundsätzlich werden die biologische Relevanz und der Algorithmus zur Auswertung der GARD™-Testmethode von der Arbeitsgruppe des ESAC als adäquat erachtet. Die Experten sind der Ansicht, dass die zu GARD™skin vorgelegten Nachweise ausreichend und angemessen sind, um seine wissenschaftliche Gültigkeit zu unterstützen. Der GARD™skin ist geeignet für eine weitere Prüfung durch die OECD im Hinblick auf die Entwicklung einer Testrichtlinie. Der GARD™skin kann zur Identifizierung von Hautsensibilisierungsgefahren im Rahmen eines "Weight-of-Evidence"-Ansatzes beitragen. Je nach dem rechtlichen Kontext können positive Ergebnisse, die mit GARD™skin erzielt werden, allein zur Identifizierung von hautsensibilisierenden Stoffen verwendet werden. Ein negatives Ergebnis, das mit diesem Test erzielt wurde, reicht jedoch möglicherweise nicht aus, um Nicht-Sensibilisierer zu identifizieren, und sollte zusammen mit zusätzlichen Nachweisen betrachtet werden.

Das ESAC hält die derzeit verfügbaren Informationen über den GARD™potency-Test nicht für ausreichend, um seine Verwendung für regulatorische Zwecke (in Kombination mit einem anderen Test) zu empfehlen. Die Verwendung des GARD™potency-Tests zur Unterscheidung von Skin Sens Kat. 1A und Kat. 1B wird derzeit durch die festgestellten Probleme bei der Reproduzierbarkeit und der Vorhersagefähigkeit aufgrund des Designs der Validierungsstudie beeinträchtigt.

Diese Bewertung ist in Hinblick auf die weitere regulatorische Anwendbarkeit des Tests sehr wichtig, hat jedoch im forschungsorientierten Umfeld eine geringere Relevanz. ESAC weist beispielsweise darauf hin, dass beide Tests (GARD™skin und GARD™potency) sehr nützlich in der herstellenden Industrie anwendbar sind zu Screening Zwecken und zur internen Entscheidungsfindung. Außerdem wird von den Experten darauf verwiesen, dass es vor allem die negativen Ergebnisse, also die Nicht-Einstufung als sensibilisierend, sind, welche als kritisch anzusehen sind. Dies hat unter anderem damit zu tun, dass die Anwendungsdomäne des Tests noch nicht abschließend untersucht wurde und hier entsprechende Unsicherheiten bestehen (z. B. unter Berücksichtigung von Faktoren wie metabolische Aktivierungskapazität des Testsystems, Flüchtigkeit der bisher verwendeten Testmaterialien, Wasserlöslichkeit derselben usw.).

¹⁸ Multi laboratory ring trial: GARD™skin: gesamt n = 28, davon n = 11 aus Trainingsset und n = 17 neues Testset; GARD™potency: gesamt n = 19, davon n = 14 aus Trainingsset und n = 5 neues Testset; auf Anforderung des ESAC wurden von SenzaGen noch weiter Substanzdaten geliefert, insgesamt waren es letztlich 59 Stoffe für GARD™skin (n = 16 Trainingsset, n = 43 neues Testset) und circa 40 Stoffe für den GARD™potency (n = 16 Trainingsset, n = 24-26 neues Testset)

Die numerisch nicht überzeugenden Werte für den GARD™potency wurden unter anderem auch durch die falsche Klassifikation eines epoxidharzrelevanten Inhaltsstoffes, dem Ethylendiamin (EDA, CAS-Nr. 107-15-3), herbeigeführt. Während die korrekte Einordnung nach der Vorgabe des Labors die Skin Sens Kat. 1B gewesen wäre, wurde in keinem der Experimente im Ringversuch EDA überhaupt als sensibilisierend erkannt und entsprechend auch keine Wirkstärkenbewertung durchgeführt. Wie bereits früher ausführlich berichtet und diskutiert liegen für EDA und dessen Dihydrochlorid zahlreiche, teils widersprüchliche Ergebnisse aus Tierversuchen, In-vitro- und In-silico-Untersuchungen vor (Heine et al., 2012; 2016). Aus der damaligen Bewertung wird eindeutig klar, dass die Auswertung von Testergebnissen zu EDA oder EDA-dihydrochlorid stark von der jeweiligen Testsubstanz, der metabolische Aktivität des Testsystems, und dem verwendeten Vehikel abhängen. Die Klasse der Amine, welche auch in diesem Forschungsvorhaben Gegenstand der Testung waren, sind sogenannte Pro-Haptene. Für Pro-Haptene ist eine metabolische Aktivierung für die Proteinreaktivität, welche die Sensibilisierung im Organismus auslöst, nötig. Wie bereits erwähnt ist die metabolische Aktivierungskapazität der verwendeten Testsysteme ein häufiges Problem von In-vitro-Testungen und auch für die SenzaCells ist dies nicht eindeutig belegt. Allerdings sind hier negative Ergebnisse kritische (somit Unterschätzung der Eigenschaft eines im lebenden Organismus ansonsten sensibilisierenden Stoffes). Da die für dieses Forschungsvorhaben getesteten Proben ein positives Ergebnis aufweisen, ist der Kritikpunkt nicht maßgeblich für die hier ermittelten validen Studienergebnisse.

Außerdem war das hier beteiligte Testlabor, die Eurofins BPT Munich GmbH, an der Validierungsstudie beteiligt und grundsätzlich wurde in diesem Testlabor die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen innerhalb des Labors („Within-laboratory reproducibility“, WLR) für beide Tests als gut befunden (jeweils WLR > 80 %, gilt als Standardmaß bei Validierungsstudien). Allerdings war das dazugehörige 95 %-Konfidenzintervall für den GARD™potency recht weit (58,6 % - 96,4%), während es für den GARD™skin im akzeptablen Bereich lag (95%-KI: 71,8-97,7%¹⁹).

Aus wissenschaftlicher Sicht trägt unsere Studie zur Erweiterung des chemischen Raums der getesteten Substanzliste im GARD™ bei und kann einen Beitrag zu regulatorischer Akzeptanz von In-vitro-Tests generell leisten (de Ávila et al., 2019).

Auch wenn die Experten der ESAC die Auswertung im Rahmen eines "Weight-of-Evidence"-Ansatzes sehen, meinen andere Autoren, dass Genexpressionsanalysen, wie im Fall des GARD, als sog. „Stand-alone“ Tests fungieren könnten (de Ávila et al., 2019; Grundstrom und Borrebaeck, 2019).

Schlussfolgerung:

Für das vorliegende Forschungsprojekt sind die Kritikpunkte des ESAC an der Validierungsstudie nicht ausschlaggebend, a) da hier Testmaterialien bewertet wurden, von denen ein sensibilisierendes Potential ausgeht und b) da der direkte Vergleich ähnlicher Testmaterialien in dieser Versuchsreihe zusätzliche Sicherheit für die Interpretation der Ergebnisse gibt.

¹⁹ Aber auch EDA wurde fälschlicherweise nicht als sensibilisierend erkannt.

4.2.2 Löslichkeit

Die Löslichkeit von Testmaterialien in den jeweiligen Testsystemen ist immer Voraussetzung für eine valide Testung. Dies trifft auf In-chemico-Systeme, zellbasierte Testsysteme (dieses Forschungsvorhaben) und auch Testungen an Tieren zu.

So wird beispielsweise für verschiedene Amine beschrieben, dass es zur Überschätzung der Wirkung oder gar zu falsch positiven Ergebnissen im lokalen Lymphknotentest an Mäusen (LLNA, dem früheren Goldstandard der Messung von Sensibilisierung) kommen kann unter Verwendung des Standardvehikels Aceton/Olivenöl (Heine et al., 2012; Watzek et al., 2017). Dies hängt hierbei jedoch nicht nur von der Löslichkeit ab, sondern von weiteren Faktoren (Instabilität des Testmaterials im Vehikel und unspezifische Effekte, welche die sensibilisierende Wirkung verstärken, siehe auch 4.1.2).

Für das Beispiel des EDA (siehe 4.2.1) und aus anderen Publikationen ist bekannt, dass es durch die unterschiedlichen Standardvehikel (Aceton/Olivenöl versus DMSO) teilweise zu Unstimmigkeiten kommt (Bergal et al., 2020). Diese müssen von Fall zu Fall neu bewertet werden.

Das hier verwendete Vehikel Dimethylsulfoxid (DMSO, CAS-Nr. 67-68-5) ist neben Wasser das Standardvehikel in zellbasierten Systemen, da die meisten Testmaterialien hierin zumindest eine gewisse Löslichkeit aufweisen und somit vergleichbare Ergebnisse für alle Testungen ermittelt werden können.

DMSO wirkt bekanntermaßen auf die Hautpenetration und kann die experimentell ermittelte Wirkstärke in Tierversuchen womöglich erhöhen (z. B. Fukuyama et al., 2008). Bei dem hier verwendeten zellbasierten Testsystem spielt die Hautpenetration keine Rolle, da ein direkter Kontakt der Materialien im Zellkulturmedium mit den Zellen zustande kommt, eine durch DMSO bewirkte Wirkverstärkung ist entsprechend nicht zu erwarten. Allerdings kann das DMSO den Eintritt der Testmaterialien in die Zellen begünstigen und damit deren mögliche zytotoxische Wirkung erhöhen (Nocca et al., 2012).

DMSO wirkt selbst ebenfalls zytotoxisch für Zellen, entsprechend ist die maximal zulässige Konzentration von DMSO in den zellbasierten Systemen auf unter 1 % festgelegt (siehe beispielsweise verschiedene OECD Prüfrichtlinien in ihrer jeweils letzten gültigen Fassung (OECD, 2015b; 2016)).

Für die Beurteilung, ob die Löslichkeit einen Einfluss auf die hier durchgeführte Testung hat, wird auf die jeweiligen Studienberichte und die dort vorliegende Bewertung hingewiesen. Exemplarisch wird eine Tabelle gezeigt, welche dem Originalstudienbericht zum IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (STUGC20AA1280-4) entnommen und entsprechend markiert wurde (siehe Abbildung 3). Man sieht, dass für den GARD Input Finder Assay die höchsten verwendeten Konzentrationen noch in Form von stabilen Suspensionen vorlagen (Experiment 1 oberer roter Kasten, Zahlenwerte markiert mit Sternchen). Da sich das Testmaterial als stark zytotoxisch erwies, wurden Konzentrationen getestet, in den denen das Testmaterial in so geringer Menge vorlag, dass eine vollständige Lösung möglich war. Die Hauptstimulation, in der die sensibilisierende Wirkung und Wirkstärke ermittelt wurden, wurde nur in einem Konzentrationsbereich durchgeführt, in dem das Testmaterial komplett gelöst vorlag (Experiment 1 und 2, unterer roter Kasten mit Pfeil).

Sample		Experiment 1		Experiment 2	
		Concentration applied [μM]	Relative Cell Viability [%]	Concentration applied [μM]	Relative Cell Viability [%]
Medium Control	--	--	100	--	100
Solvent Control	--	--	99.9	--	100.1
DBC-20-B4 	A1	61.8*	0.00	23.4	0.00
	A2	49.5*	0.00	18.7	0.00
	A3	37.1*	0.00	14.0	0.00
	A4	24.7*	0.00	12.1	0.00
	A5	12.4	0.00	10.3	84.1
	A6	6.2	84.0	8.4	89.2
	A7	4.1	93.2	6.5	94.8
	A8	2.1	102.1	4.4	100.2
	A9	0.8	101.0	2.2	100.9

* Working stock solution of the test item built a stable suspension in medium

Abbildung 3 Exemplarische Darstellung der Ergebnisse aus einem GARD Input Finder Assay und Auswertung bzgl. Löslichkeit im Hauptversuch

Aus dem Originalstudienbericht zu STUGC20AA1280-4 zum IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH entnommen.

Schlussfolgerung:

Für alle hier durchgeführten Testungen erfolgte die Messung der für die Bewertung relevanten Gensignatur (GPS) in einem Konzentrationsbereich, bei dem keine Präzipitate oder Trübung vorlagen, so dass die Messung nicht durch mangelnde Löslichkeit beeinträchtigt war.

4.2.3 Zytotoxizität und Reizwirkung

Auf Basis der Anfälligkeit der zellbasierten Systeme für zytotoxische Effekte besteht die Tendenz der Überschätzung. Deswegen müssen zytotoxische Effekte immer parallel überwacht werden. Beispielsweise tendiert der KeratinoSens dazu, die sensibilisierende Wirkung der untersuchten Stoffe zu überschätze; allerdings werden Stoffe mit geringer sensibilisierender Wirkstärke häufig unterschätzt (d.h. nicht erkannt). Dasselbe gilt für den h-CLAT (Bergal et al., 2020). Dieser Effekt ist insofern auch für den ebenfalls zellbasierten GARD™ wahrscheinlich. Allerdings hat dies keinen maßgeblichen Einfluss auf die Auswertung im vorliegenden Forschungsvorhaben, da der relative Vergleich der getesteten Epoxidharz-inhaltsstoffe im Vordergrund stand.

Mechanistische Überlegungen machen den Zusammenhang zwischen Zytotoxizität im zellulären System bzw. der Reizwirkung einer Substanz auf Organismusebene und der Sensibilisierung klar. Eine Reizwirkung kann eine sensibilisierende Wirkung durch die sogenannten „Danger signals“ verstärken, dies ist nicht neu und so wird in Standardtierversuchen

ebenfalls darauf verwiesen, dass nur Konzentrationen, welche höchstens eine leichte Reizwirkung erkennen lassen, geprüft werden (OECD, 2002) (OECD, 1992)²⁰. Allgemein kann die Zytotoxizität die zelluläre Stressantwort erhöhen und aktiviert dadurch den Keap1-Nrf2-Signaltransduktionsweg (Bergal et al., 2020). Proteine dieses Signaltransduktionsweges sind an der Sensibilisierungsreaktion beteiligt und beispielsweise im KeratinoSens das Ziel der Messung. Eine Kontrolle wie in den Tierversuchen zur Reizwirkung ist daher für die Zytotoxizität ebenfalls notwendig (Details siehe unten).

Außerdem enthält die im GARD™ zu analysierende Gensignatur, obwohl sie streng empirisch entwickelt wurden, Gene, die laut OECD AOP zur Hautsensibilisierung in kausalem Zusammenhang stehen (siehe auch Corsini et al., 2021). Diese „GARD prediction signature“ (GPS) macht daher Vorhersagen zur immunologischen Sensibilisierungsreaktion und nicht zur Zytotoxizität.

Vom Testentwickler wurde tatsächlich eine Beziehung zwischen beobachteter Zytotoxizität und den generierten Entscheidungswerten („decision values“, DV) identifiziert, diese Korrelation ist jedoch weder linear noch ausreichend stark, um prädiktiv zu sein (Johansson et al., 2017). Die zur Auswertung herangezogenen **DV-Werte hängen von mehreren Eigenschaften ab, die Zytotoxizität ist nur eine davon**. Es gibt auch Chemikalien, die Zytotoxizität in Übereinstimmung mit den im Protokoll festgelegten Grenzwerten induzieren, die anschließend negative DV-Werte zeigen.

Die Diskussion um den Einfluss der Reizwirkung bzw. Zytotoxizität währt schon so lange wie Testmethoden entwickelt werden. Es wäre grob vereinfachend und nicht korrekt zu behaupten, dass reizende Substanzen grundsätzlich falsch positive Ergebnisse liefern. So schreiben zum Beispiel Basketter und Kimber (2011) „...it is very clear that, of itself, skin irritation is not a cause of false positive results.“

Der Einfluss der Zytotoxizität wird im vorliegenden Testsystem dadurch kontrolliert, dass die Messung der für die Bewertung relevanten Gensignatur (GPS) in einem Konzentrationsbereich liegen muss, bei dem die Zytotoxizität auf maximal 15 % beschränkt ist (RV90 definiert als relative Lebensfähigkeit von 90 % \pm 5 % (siehe auch 3.1.2)). Dieses Vorgehen ist dem Vorgehen aus anderen zellbasierten Testmethoden ähnlich. Über 80 % lebende Zellen als Validitätskriterium eines solchen Tests sind dabei üblich.

Die im Vortest zur Zytotoxizität (GARD Input Finder Assay) ermittelte sogenannte GARD input concentration (im Zellkulturmedium) belegt für die hier getesteten Materialien die folgenden zwei Situationen:

- Nicht zytotoxische und lösliche Verbindungen: maximal zu verwendende Konzentration 500 μ M

Dies trifft auf das TEPA zu. Und

- Zytotoxische Verbindungen: Konzentration, die 90 % relative Lebensfähigkeit (RV90) ergibt

Dies trifft auf die Präpolymere und das Polyamidoamin zu. Die Zytotoxizität nimmt dabei in der folgenden Reihenfolge ab:

²⁰ in der jeweils aktuellen Fassung

Polyamidoamin ($< 10 \mu\text{M}$) $>$ IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH \approx 1,3-BAC-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (jeweils $\sim 40\text{-}70 \mu\text{M}$) $>$ TEPA-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH ($\sim 220 \mu\text{M}$).

Da der Bezug zwischen Zytotoxizität und Reizwirkung bereits hergeleitet wurde, kann für die Analyse, welcher der Bestandteile der Präpolymere eventuell die Zytotoxizität bestimmt stellvertretend die reizende Wirkstärke herangezogen werden (siehe Tabelle 6 in Spalte „Einstufung nach C&L inventory“).

Die in der Zusammensetzung vergleichbaren Präpolymere auf Basis DGEBA unterscheiden sich nur in dem verwendeten Amin (IPD, 1,3-BAC, TEPA). Anhand der ermittelten Testergebnisse und der zusätzlichen Informationen zu den Einzelbestandteilen, kann versucht werden den Zytotoxizitäts-bestimmenden Anteil zu ermitteln. Die zu prüfende These ist: die Reizwirkung des jeweiligen Amins ist bestimmend für die gefundene Zytotoxizität des jeweiligen Präpolymers.

Für diese These spricht die Beobachtung, dass die IPD- und 1,3-BAC-Präpolymere, bei denen das zugrundeliegende Amin als Skin Corr 1A eingestuft ist, eine vergleichbare zytotoxische Wirkung auf die Zellen aufweisen. Diese ist stärker ausgeprägt als die durch das TEPA-Präpolymer ausgelöste Zytotoxizität. TEPA selbst ist als weniger stark reizend eingestuft, Skin Corr 1B.

Gegen diese These spricht allerdings die Beobachtung, dass im Versuch mit TEPA, als Monomer, keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen gefunden wurde. Entsprechend ist davon auszugehen, dass bei den Präpolymeren nicht nur die jeweilige Aminkomponente bestimmend für die Zytotoxizität ist. Die Kombination mit dem DGEBA (welches aber immer Amin-terminiert ist und entsprechend nicht mit dem Bisphenol A-diglycidylether (CAS-Nr. 1675-54-3) verglichen werden kann) und dem Benzylalkohol scheint Einfluss zu nehmen.

Für den DGEBA-Amin Anteil liegen keine Informationen zur Zytotoxizität oder der Reizwirkung vor. Eine Prüfung ist entsprechend nicht möglich.

Benzylalkohol wird nicht als reizend für die Haut, wohl aber als reizend für die Augen eingestuft (Eye Irrit. 2). In einem In-vitro-Test zur Zytotoxizität in menschlichen Hautfibroblasten wurde bereits ab 1 % eine starke Zytotoxizität belegt (de Carvalho et al., 2012). Allerdings liegt die im vorliegenden Test eingesetzte Konzentration weit darunter ($\ll 1 \%$) und kann somit den Effekt allein nicht erklären.

Es kann nicht eindeutig belegt werden, welcher der Bestandteile die beobachtete, teils starke Zytotoxizität auslöst. Dies ist jedoch auch nicht zwingend erforderlich, da die getesteten Präpolymere in dieser Zusammensetzung in Epoxidharzsystemen vorkommen könnten (ggfs. sie sind technisch anwendbar) und entsprechend sind die Untersuchungen praxisrelevant.

Schlussfolgerung:

Für die im Forschungsvorhaben durchgeführte Testung im GARD™ ist in Bezug auf die Zytotoxizität folgendes zu sagen, a) die beobachtete zytotoxische Wirkung weist auf Reizwirkung der Stoffe hin, b) die Zytotoxizität ist gemäß den allgemein gültigen Richtlinien für In-vitro Testungen gut kontrolliert und c) trotz der beobachteten Zytotoxizität liefert die Gensignaturanalyse valide Ergebnisse für die Sensibilisierungseigenschaft und -wirkstärke.

4.2.4 Sensibilisierende Wirkstärke

Um die sensibilisierende Wirkstärke von Epoxidharzsystemen zu verringern, können grundsätzlich zwei Strategien verfolgt werden:

- i. Chemische Veränderung der Harzkomponente oder
- ii. Verwendung von Präpolymeren in der Härterkomponente.

Die Arbeitsgruppe um Ann-Therese Karlberg verfolgt die Strategie unter i. Es wird postuliert, dass durch Veränderung der chemischen Struktur (z.B. Kettenlängenerweiterung, Entfernung eines Sauerstoffatoms, Dearomatisierung der Ringsysteme) weniger stark sensibilisierende Epoxidharzmonomere (ERM) hergestellt werden können (O'Boyle et al., 2014; O'Boyle et al., 2012). Die untersuchten ERMs sind meist Diglycidylether von Bisphenol A (DGEBA), welche auch Bestandteil der DGEBA-Präpolymere sind. Die veränderten ERMs sind gut definierte Einzelstoffe und die Durchführung und Auswertung verschiedener Tests (LLNA und Kerationo-Sens) war gut möglich. Während die Ergebnisse aus den Versuchen zur Hautsensibilisierung vielversprechend aussahen (Bewertung siehe auch Heine et al., 2016) wurde in einer späteren Arbeit festgestellt, dass sich die technischen Eigenschaften dieser Epoxidharzmonomere für die Harzkomponente stark ändern. Es besteht ein sehr empfindliches Gleichgewicht zwischen der sensibilisierenden Aktivität und den Polymerisationseigenschaften von Epoxidharzsystemen. Die Abstimmung der strukturellen Eigenschaften in Bezug auf weniger stark sensibilisierende Stoffe zusammen mit der Untersuchung der technische Eignung unter bestimmten Polymerisationsbedingungen könnte laut den Autoren jedoch in der industriellen Forschung und Entwicklung zukünftig weiter eingesetzt werden (Ponting et al., 2019).

Das vorliegende Forschungsvorhaben widmet sich der unter ii genannten Strategie zur Verbesserung der Härterkomponente. Speziell der Verwendung von Präpolymeren anstelle von freien Aminmonomeren. Die zugrunde liegende Hypothese ist, dass das Risiko für die Sensibilisierung beim Anwender umso geringer ist, je geringer die Anzahl der reaktiven Gruppen in der Epoxidharzkomponente ist. Dies kann aus einer Hypothese von Ivanova und Kollegen (2020) abgeleitet werden. Die Autoren postulieren, dass es gewisse Schwellenwerte der geformten Hapten-Protein-Addukte für die unterschiedliche Stärke der sensibilisierenden Wirkung gibt. Je mehr Hapten-Protein-Addukte durch einen Stoff oder seine entsprechenden Metabolite (innerhalb einer gewissen Zeit) gebildet werden, desto stärker sensibilisierend ist ein Stoff. Diese Hypothese ist auch die Grundlage für ein In-Chemico-Testverfahren, den DPRA, und speziell für die neu entwickelte Variante des sogenannten kinetischen DPRA (OECD, 2015a, siehe Appendix III in der Aktualisierung vom 17. Juni 2021) zur Wirkstärkenbewertung (Einstufung in Kategorie 1A möglich nach Bewertung des Logarithmus der maximalen Geschwindigkeitskonstante einer Testsubstanz im Test). Zur Prüfung der Hypothese wurden die hier beschriebene In-Vitro-Testung des FP-451 durchgeführt. Im Gegensatz zur Situation bei Strategie i²¹ ist für ii die technische Eignung der Präpolymere bereits belegt, jedoch ergeben sich Schwierigkeiten für die Testung, da die Testmaterialien nicht so gut charakterisiert werden können, wie es für Einzelstoffe der Fall ist. Dies führt zu Herausforderungen in der Testdurchführung und der Auswertung.

²¹ Testmaterialien gut definierte Einzelstoffe, jedoch mit technisch stark veränderten Eigenschaften, welche die Eignung für Epoxidharzsysteme in Frage stellt.

Auf Basis dieses Sachverhalts und wie in 3.2 bereits ausgeführt ist die Bestimmung des Molekulargewichts für alle hier verwendeten Testmaterialien, außer beim definierten Einzelstoff (TEPA), nicht trivial. Das Molekulargewicht geht aber in die Testdurchführung im Sinne der eingesetzten Stoffmenge und in die Auswertung zur sensibilisierenden Wirkstärke ein.

In der Anfangsphase des Projekts wurde im Sinne einer konservativen Bewertung unter Berücksichtigung der Unsicherheit der Molarität der Bestandteile zunächst die obere Molekulargewichtsgrenze des Polymeranteils für die Testung und Auswertung zugrunde gelegt. Vor allem bei der Auswertung ist unter Einbezug eines höheren Molekulargewichts ein konservatives Ergebnis zu erwarten. Mit diesem Ansatz ergab sich für alle Präpolymere auf Basis des DGEBA zunächst das Bild, dass sie stark sensibilisierend sind. Dieses Ergebnis widersprach der Beobachtung aus den Vorgängerprojekten und auch dem direkten Vergleich aus der aktuellen Versuchsreihe zwischen dem TEPA-Monomer und dem TEPA-Präpolymer. Mechanistisch ist nicht zu erklären, warum das TEPA-Präpolymer stärker sensibilisierend sein sollte als das TEPA-Monomer. Der Einfluss der beobachteten Zytotoxizität ist, wie oben diskutiert, im vorliegenden Test gut kontrolliert und scheidet demnach als mögliche Erklärung aus. Nach Diskussion mit dem durchführenden Labor war klar, dass die konservative Bewertung nicht realitätsnah für diese Art von Testmaterial ist, und entsprechend wurden alternative Auswertemöglichkeiten verfolgt, a) die Auswertung mittels eines alternativer Vorhersagemodells (Modell 1 nach Gradin et al., 2020) und b) die Verwendung des gewichteten mittleren Molekulargewichts aller Bestandteile der Präpolymere (numerische Ergebnisse für die Auswertung nach a) und b) siehe Tabelle 4).

Der Einfluss des Molekulargewichts für die Auswertung wurde in der Entwicklung des Vorhersagemodells zum In-vitro-Test erforscht (Gradin et al., 2020). Die Vorhersagen von zwei möglichen Modellen wurden mit den bekannten Wirkstärkeneinstufungen für die getesteten Materialien verglichen. Der Algorithmus von Modell 1 basiert dabei nur auf den 51 genomischen Biomarkern (d.h. ohne Einbezug des Molekulargewichts der getesteten Substanzen), während der Algorithmus des Modell 2 neben den 51 genomischen Biomarkern auch die „GARD input concentration“ (und somit das Molekulargewicht) berücksichtigt. In der Entwicklungsphase ergab sich eine unwesentlich bessere Vorhersagegenauigkeit für das Modell 2 (mit 82 % im Vergleich zu Modell 1 mit 78 %). Für die Validierung wurde aus diesem Grund nur das Modell 2 betrachtet und ist deswegen auch das im Standardvorgehen zunächst bevorzugte Verfahren der durchführenden Labore. Der „Fehler“, der sich jedoch aus der Unsicherheit der Bestimmung des Molekulargewichts bei den hier eingesetzten Präpolymeren und dem Polyamidoamin ergibt, ist wahrscheinlich größer als die zusätzlich gewonnene statistische Genauigkeit der Vorhersage mit Modell 2. Dies spricht für die Verwendung des Modell 1 im vorliegenden Forschungsvorhaben.

Dies wird klar durch die Plausibilitätsbetrachtung der Ergebnisse zu TEPA und dem TEPA-Präpolymer. In der konservativen „Standardauswertung“ mit Modell 2 und der oberen Molekulargewichtsgrenze wird dem TEPA die Kategorie Skin Sens 1B und dem TEPA-Präpolymer die Skin Sens 1A zugeordnet. Dies ist mechanistisch nicht plausibel, da bei geringerer Reaktivität des TEPA-Polymers keine höhere Wirkstärkenkategorie zugeordnet werden sollte. Die Zuordnung des TEPA-Monomers zur Kategorie Skin Sens 1B ist durch viele weitere experimentelle Daten gut belegt. Das ebenfalls noch enthaltene Lösemittel – Benzylalkohol – ist allenfalls auch nur schwach sensibilisierend (experimentell belegt). Wird das Modell 1 (ohne Einbezug des Molekulargewichts) zur Auswertung herangezogen, ergibt

sich für das TEPA-Präpolymer eine andere Wirkstärkekategorien als in der „Standardauswertung“. Diese ist mechanistisch plausibel. Das TEPA-Monomer und das TEPA-Präpolymer sind nun in derselben Wirkstärkekategorie (Skin Sens 1B).

Wird das gewichtete mittlere Molekulargewicht der Präpolymere in Modell 2 verwendet anstelle der sehr konservativen Annahme der oberen Gewichtsgrenze des Polymeranteils, findet man ebenfalls geänderte Wirkstärkekategorien für das betroffene TEPA-Präpolymer. Diese stimmt mit der oben genannten Alternativauswertung mit Modell 1 für TEPA und das TEPA-Präpolymer überein. Die anderen DGEBA-Präpolymere sind jedoch immer noch als stark sensibilisierend identifiziert. Wie bereits in 4.1.3 erwähnt sind sowohl das IPD als auch das 1,3-BAC stark sensibilisierende Monomere. Es scheint, dass der noch frei vorliegende Anteil (leicht über 30 %) ausreichend ist, um ein Ergebnis als stark sensibilisierende (Skin Sens 1A) zu induzieren, dass die hohe sensibilisierende Wirkstärke des Amins wiedergibt.

Die Vorhersagen der alternativen Auswertungsmodelle stimmen in ihrer Wirkstärkenvorhersage überein und erhöhen so deren Vertrauenswürdigkeit. Entsprechend wird die durch diese Bewertung ermittelte Wirkstärke für die weitere Bewertung herangezogen.

In der Diskussion mit den Experten des AK EIS wurde die Frage gestellt, ob in der Reihentestung eine Abstufung der sensibilisierenden Wirkstärke auf Basis der ermittelten DV-Zahlenwerte aus dem GARD™potency abzulesen ist. Die Testentwickler verneinten dies und bekräftigten die Aussage, dass der Algorithmus allein die Trennung um den Null-Wert zulässt ($DV \geq 0 \rightarrow$ Skin Sens 1A; $DV < 0 \rightarrow$ Skin Sens 1B (siehe 3.1.2)). Ähnliche Auswertungen wie es sie bei gezielten In-vitro-Testungen für andere Inhaltsstoffe in Vorgängerprojekten gab, sind entsprechend hier nicht möglich.

Schlussfolgerung:

Durch die Verwendung alternativer Auswertungsmodelle konnten verlässliche Aussagen für die Wirkstärkenbewertung getroffen werden. Diese sind mechanistisch plausibel und werden im Weiteren für die Bewertung der einzelnen Präpolymere herangezogen und erlauben zudem generelle Aussagen (siehe 4.2.6).

4.2.5 Generelle Probleme von In-vitro-Testsystemen bzw. „New Approach Methodologies“ (NAM) zur Hautsensibilisierung

Für alle Testsysteme (unabhängig ob In-vitro oder In-vivo) gilt, dass sie mittels weniger Substanzen, die ein gewisses Spektrum des chemischen Universums abdecken, etabliert und mit einem etwas größeren Datensatz validiert werden. Zumeist sind das eher gut lösliche, gut definierte, kleinere Moleküle (Kolle et al., 2020). Dies trifft auf das hier verwendete Testsystem den GARD™ (siehe beispielsweise Corsini et al., 2021), ebenso wie auf andere Systeme (auch den LLNA) zu.

Im vorliegenden Projekt wurden komplexe, nicht gut definierbare Mischungen verschiedener Verbindungen (Ausnahme TEPA) getestet. Dies stellt jedes Testsystem vor größere Herausforderungen. Eine Testung der Stoffe im DPRA ist beispielsweise für Testmaterialien dieser Art nicht möglich, da solche Stoffe in der Anwendungsdomäne ausgenommen sind.

Die sich ergebenden Probleme für die Testung im GARD™ wurden in den vorangegangenen Kapiteln bereits diskutiert und, obwohl es gewisse Einschränkungen gibt, wurde es deutlich, dass die Testung gut kontrolliert durchgeführt wurde und valide Ergebnisse für die Materialien liefert. Allerdings ist erkennbar, dass für diese Art von Substanzen, die strukturell nicht

eindeutig definiert sind, nicht das für die Validierung vorgesehene Vorhersagemodell (Modell 2: SVM basierend auf 51 genomischen Biomarkern UND der GARD input concentration, d.h. abhängig vom Molekulargewicht) zielführend ist, sondern eher das alternative Modell 1 („Support Vector Machine“ (SVM) basierend auf 51 genomischen Biomarkern).

Ein Kritikpunkt an den zellbasierten In-vitro-Tests ohne funktionale Hautbarriere ist immer, dass die nach „adverse outcome pathway“ (AOP) zur Hautsensibilisierung (OECD, 2012b) vorausgesetzte Penetration der als sensibilisierend anerkannten Stoffe nicht abgeprüft werden kann. Denn theoretisch wäre es möglich, dass ein Stoff proteinreaktiv ist und in den einzelnen zellbasierten Tests positive Ergebnisse auslöst, jedoch auf Basis seiner sonstigen Eigenschaften im lebenden Organismus nie die Zielzellen für den biologischen Effekt erreichen würde. Dem kann entgegengesetzt werden, dass die früher geltende Regel, dass Substanzen, die ein gewisses Molekulargewicht haben, wegen mangelnder Hautpenetration nicht als sensibilisierend zu bewerten sind, keinen Bestand mehr hat (Esser und Martin, 2017). Außerdem kann dieses Argument durch Verwendung von Testsystemen, welche auf künstliche Hautmodelle zurückgreifen (wie beispielsweise der SENS-IS, siehe Cottrez et al., 2015; Cottrez et al., 2016) umgangen werden (Bergal et al., 2020; Cottrez et al., 2020). Der Vorteil dieser Art von Tests, die eine Hautbarriere in irgendeiner Form berücksichtigen (SENS-IS, Tierversuche mit intakter Haut, Humanbefunde), ist zudem, dass sie den Einfluss von Lösemitteln auf das Wirkstärkenergebnis etwas realer abbilden können (Cottrez et al., 2020; Jowsey et al., 2008).

Ursprünglich war ein Parallel-Projekt zu diesem Forschungsvorhaben unter Verwendung des SENS-IS als Testmodell vorgesehen. Die Testung im SENS-IS hätte ergänzende Informationen zur Durchdringung der Hautbarriere liefern können. Sie konnte aber auf Basis limitierter finanzieller Ressourcen und weitere Faktoren nicht durchgeführt werden.

Während die Testentwicklung der verschiedenen In-chemico-, In-vitro- und In-silico-Protokolle in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt hat, besteht aus regulatorischer Sicht immer noch eine gewisse Unsicherheit in der Bewertung der mit diesen als „new approach methodologies“ (NAM) bezeichneten Methoden. Vor allem die Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke wird immer noch als kritisch erachtet. Der identifizierte Forschungsbedarf liegt vor allem im Bereich von geeigneten Referenzstandards, Methoden, in denen die Dosis-Wirkungsbeziehung besser bewertet werden kann, der Bewertbarkeit der Anwendungsdomäne des jeweiligen Tests, den jeweiligen technischen Limitierungen und der Notwendigkeit der Entwicklung eines einheitlichen Rahmenkonzeptes zur „Weight-of Evidence“-Bewertung der Testergebnisse (Basketter et al., 2020).

Diesen Forderungen wurde von Seiten der Entwickler teilweise schon nachgekommen. So sind beispielsweise bereits Weiterentwicklungen von Tests wie dem DPRA und auch dem GARD™ vorhanden, welche die Dosis-Wirkungsbeziehung berücksichtigen (Natsch et al., 2015; Natsch et al., 2020; SenzaGen, 2021; Wareing et al., 2020). Die erst kürzlich erschienene OECD-Prüfrichtlinie 497 (OECD, 2021), zeigt zudem auf, wie verschiedene Test kombiniert werden können, um a) eine sensibilisierende Wirkung zu bestimmen und b) die sensibilisierende Wirkstärke einzuschätzen.

Somit haben die In-vitro-Testsysteme erwartungsgemäß mit den gleichen Problemen bei der (semi-)quantitativen Wirkstärkenbestimmung umzugehen, wie sie in ähnlichem Ausmaß auch bei den früher durchgeführten In-vivo-Studien im Vergleich zu Humanbefunden vorlagen (Hoffmann et al., 2018).

Schlussfolgerung:

Die generellen Beschränkungen, die für alle NAM in gewisser Weise gelten, treffen auch auf den hier verwendeten GARD™ zu. Der gesellschaftliche Konsens und beispielsweise auch die REACH-Regulation verbietet jedoch die Verwendung von Tieren zu Versuchszwecken für den Endpunkt Hautsensibilisierung. Aus diesem Grund ist die Verwendung von In-vitro-Versuchen oder computergestützten Modellierungen für die neue Testung von sensibilisierenden Wirkungen unumgänglich.

Hilfreich, um die hier erzielten Ergebnisse zu bestätigen wäre die zusätzliche Testung der Stoffe im SENS-IS. Die Testkombination, wie sie beispielsweise in der OCED-Prüfrichtlinie 497 zur Wirkstärkenbewertung vorgesehen ist (h-CLAT + DPRA + In-silico-Modellierung) kann für die Präpolymere nicht angewandt werden, da sie a) nicht in die Anwendungsdomäne des DPRA fallen und b) für die computergestützte Auswertung eine eindeutig definierte Molekularstruktur erforderlich ist.

4.2.6 Praktische Anwendung der Wirkstärkenbewertung der Präpolymere**4.2.6.1 Der Epoxidharz-Inhaltsstoffe-Rechner**

Wie bereits in der Problemstellung zu diesem Forschungsvorhaben beschrieben (siehe 2.1), wird die Grundidee, dass als präventive Maßnahme die Wirkstärkenbewertung der einzelnen Inhaltsstoffe, welche dann die Basis ist für die Substitution von stark sensibilisierenden Inhaltsstoffen durch nur schwach sensibilisierende Inhaltsstoffe dient, vorangetrieben. Für viele Inhaltsstoffe wurden bereits Wirkstärkenbewertungen durchgeführt (Dilger und Heine, 2018; Hassauer und Heine, 2019; Heine et al., 2012; 2016) und auch die In-Vitro-Testergebnisse aus diesem Forschungsvorhaben liefern entsprechende Einstufungen.

Um diese Bewertungen der sensibilisierenden Wirkstärke zugänglich zu machen und eine praktische Anwendung zu ermöglichen, wurde auf Basis der Ergebnisse des DGUV-geförderten Vorgängerprojekts (Heine et al., 2016) und in der Fortführung dieser Arbeit im AK EIS der Epoxidharz-Inhaltsstoffe-Rechner (EIS-Rechner, EIS-Gemischerechner) entwickelt (Kersting et al., 2021; Labs, 2020).²²

Hier können auf Basis der Informationen zur Zusammensetzung aus den Sicherheitsdatenblättern von Epoxidharzsystemen zwei Produkte in Hinsicht auf ihre jeweilige sensibilisierende Wirkstärke hin verglichen werden. Die technische Vergleichbarkeit beider Produkte sollte ebenfalls gegeben sein.

Der Vergleich erfolgt anhand einer sogenannten Gefährdungszahl (GZ), welche unter Berücksichtigung der sensibilisierenden Wirkstärke der Inhaltsstoffe, deren Konzentration in der jeweiligen Komponente, der Mischungsverhältnisse der einzelnen Komponenten und möglicher verstärkender Eigenschaften (Reizwirkung, siehe 4.2.3) der Inhaltsstoffe berechnet wird. In Abbildung 4 ist ein typisches Eingabefeld des EIS-Gemischerechners gezeigt.

²²Nach kostenloser Registrierung zugänglich unter <https://www.eis-epoximixrechner.de/willkommen/>

HARZ		Name: HARZ 2								
Stoffname	CAS-Nr.	Anteil in Komponente			Wirkst	Ätzend	Einstufungen	Warnungen		
		Von [%]	Bis [%]	Gewählt [%]						
x Bisphenol A-Harze	25068-38-6	30,0	60,0	60,0	HS	0	H315, H317, H319, H411	-		
x Bisphenol F-Harze	9003-36-5	2,5	10,0	10,0	HS	0	H315, H317, H411	-		
x 1,6-Hexandiol-diglycidylether	16096-31-4	2,5	10,0	10,0	HS	0	H315, H317, H319, H412	-		
x C12/C14-Monoglycidylether	68609-97-2	2,5	40,0	40,0	GMS	0	H315, H317	-		
x Benzylalkohol	100-51-6	2,5	10,0	10,0	Nein	0	H302, H332	-		
unbekannt oder inert	-	-	-	0,0						

Abbildung 4 Eingabemaske des EIS-Gemischerechners

Eingabe für eine exemplarische Harzkomponente. In der Spalte „Wirkst“ ist dabei die differenzierte sensibilisierenden Wirkstärke (HS: hoch, GMS: gering oder mäßig) aufgeführt.

Nach der Eingabe aller zu betrachtenden Inhaltsstoffe aus allen Komponenten kann die jeweilige Gefährdungszahl (GZ) für die einzelne Komponente (Harz, Härter oder Füllstoffe) oder das gesamte Epoxidharzprodukt abgelesen werden (siehe Abbildung 5).

Detailanalyse			
Gefährdungszahl Einzelkomponenten			
	Harz	Härter	Füllstoffe
Beschichtungsmittel #1	750,00	5 625,00	0,00
Beschichtungsmittel #2	750,00	2 625,00	0,00

Abbildung 5 Detailanalyse bezüglich der sensibilisierenden Gefährdung durch die einzelnen Komponenten zweier exemplarischer Beschichtungsmittel (#1 und #2)

Oder der Vergleich zweier technisch ähnlicher Produkte durchgeführt werden (siehe Abbildung 6).

Ergebnis Produktvergleich				
	Gefährdungszahl	Wertdiff.	Klassifizierung	Ätzend
Beschichtungsmittel #1	1 050,00	350,00	VI	1,50
Beschichtungsmittel #2	700,00		IV	1,00

Abbildung 6 Ergebnis bezüglich der sensibilisierenden Gefährdung des Produktvergleichs von zwei exemplarischen Beschichtungsmitteln

Um Scheingenauigkeiten auf Basis der Zahlenwerte für die Gefährdungszahlen zu vermeiden und grobe Vergleiche zu ermöglichen, werden den Produkten jeweils Gefährdungsklassen zugeordnet. Insgesamt gibt es sechs Gefährdungsklassen (I bis VI, siehe Abbildung 7).

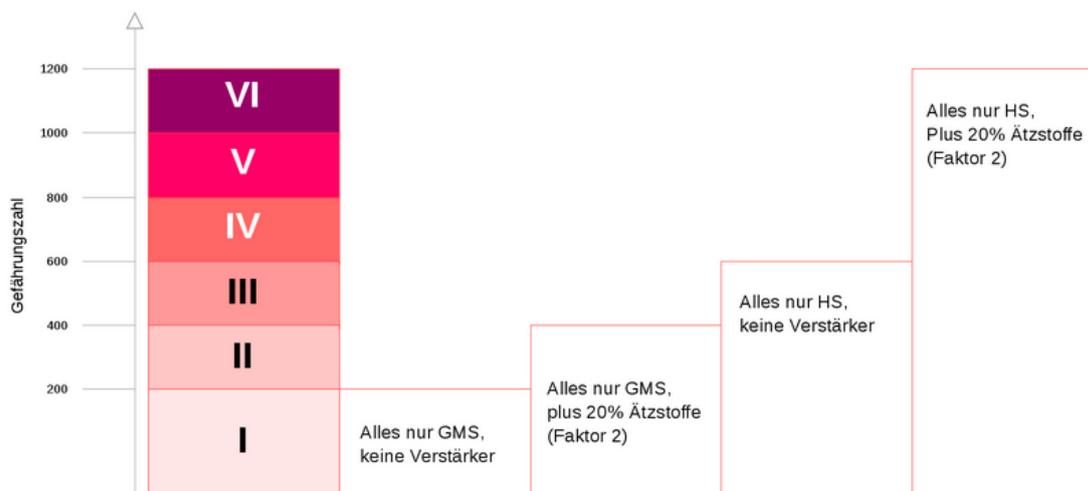


Abbildung 7 Einordnung der Gefährdungszahl in Gefährdungsklassen

Weitere Erklärungen hierzu im „Hintergrund“ auf der Seite des EIS-Gemischerechners unter <https://www.eis-epoximixrechner.de/infos/>

Auch wenn nicht näher auf die Ergebnisse für die zwei Härter-Gemische eingegangen wurde (siehe Tabelle 4), so ist durch deren Vergleich ersichtlich, dass sich die theoretisch erwartete Differenzierung laut Gemischerechner auch im In-Vitro-Testergebnis widerspiegelt (Härter-Gemisch 1 mit GZ = 2750, Klasse VI ist auch stärker sensibilisierend als Härter-Gemisch 2 mit GZ = 675, Klasse IV). Die grundlegenden Annahmen für die Berechnung der Gefährdungszahlen im EIS-Gemischerechner sind somit bestätigt („proof-of-concept“).

Schlussfolgerung:

Der EIS-Gemischerechner ist ein einsatzfähiges Werkzeug für die praxisnahe Anwendung zur Beurteilung von Epoxidharzprodukten. Er kann der herstellenden Industrie bzw. den Formulieren von Epoxidharzsystemen als Werkzeug zur Entwicklung weniger stark sensibilisierender Systeme dienen. Die Unfallversicherungsträger können den EIS-Gemischerechner ihren Mitgliedsbetrieben empfehlen. Die Fachkräfte für Arbeitssicherheit (Sifa) von Betrieben mit Epoxidharzanwendungen können dann für die jeweiligen Arbeitsplätze Substitutionsmöglichkeiten identifizieren und entsprechende Anpassungen vornehmen.

4.2.6.2 Verbesserte Bewertung von Härtern mit Präpolymeren (PolyH)

Auf Basis der vielversprechenden Ergebnisse in Vorgängerprojekten und den mechanistischen Überlegungen in Bezug auf den Einfluss der reaktiven Gruppen von Epoxidharz-Inhaltsstoffen für weniger stark sensibilisierende Inhaltsstoffe wurden schematische Überlegungen angestellt, inwiefern eine verbesserte Bewertung der Präpolymer in den Gemischerechner eingehen kann und was die dafür notwendigen Voraussetzungen sind. Diese Verbesserungen wurden notwendig, da bei der ursprünglichen Bewertung eines ungetesteten Präpolymers, welches dann als stark sensibilisierend (HS – hohe sensibilisierende Wirkstärke) in die Berechnung einging, aus der jeweils errechneten Gefährdungszahl keine Differenzierung sichtbar war zwischen den konventionellen Produkten mit den freien Aminen in der Härterkomponente und der technischen Weiterentwicklung mit den weniger reaktiven Präpolymeren (siehe Abbildung 8). Die Bewertung mit HS erfolgt im Gemischerechner immer

dann, wenn eine ungenügende Datenlage für einen Inhaltsstoff vorliegt und ist ein notwendiges, konservatives Vorgehen im Sinne des Arbeitsschutzes.

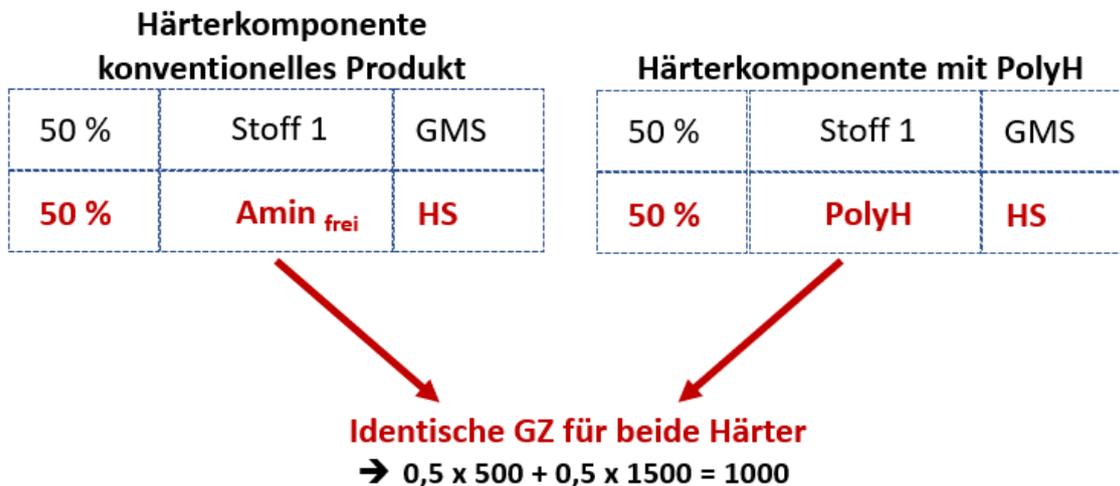


Abbildung 8 Schematisches Vorgehen im EIS-Gemischerechner bei der Bewertung von Härterkomponenten

Die prozentualen Anteile der Inhaltsstoffe in den Produkten sind beispielhaft gewählt und stark vereinfacht, HS: Hohe sensibilisierende Wirkstärke, dieser wird im EIS-Gemischerechner ein Zahlenwert von 1500 zugewiesen, GMS: Geringe bis mäßige sensibilisierende Wirkstärke, dieser wird im EIS-Gemischerechner ein Zahlenwert von 500 zugewiesen, PolyH: Zum Beispiel DGEBA-Präpolymer

Das verbesserte schematische Vorgehen wurde dabei zunächst auf Basis von Präpolymeren (PolyH) entwickelt. Chemisch handelt es sich um Reaktionsprodukte, zum Beispiel aus einem BPA-Harz wie Bisphenol-A-diglycidylether (BADGE/DGEBA, CAS-Nr. 1675-54-3) mit einem Amin und ggfs. einem Additiv. Die oligomeren bzw. polymeren Reaktionsprodukte liegen in den Sicherheitsdatenblättern meist als UVCB²³-Stoffe vor. Grundsätzlich setzen sich die präpolymerisierten Inhaltsstoffe (PolyH, Präpolymer) entsprechend aus a) einem adduktierten Aminanteil (Amin_{Addukt}), b) einem Restgehalt an freiem Amin (Amin_{frei}) und ggfs. c) Additiv in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zusammen. Laut Information aus der Industrie ist es auf Basis von physikalischen/chemischen Trennverfahren technisch möglich eine Desaggregation vorzunehmen und die einzelnen Bestandteile eines Präpolymers anteilig auszuweisen (siehe Abbildung 9).

²³ Stoffe mit unbekannter oder variabler Zusammensetzung, komplexen Reaktionsprodukten oder biologischen Materialien (UVCB bedeutet *Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials*)

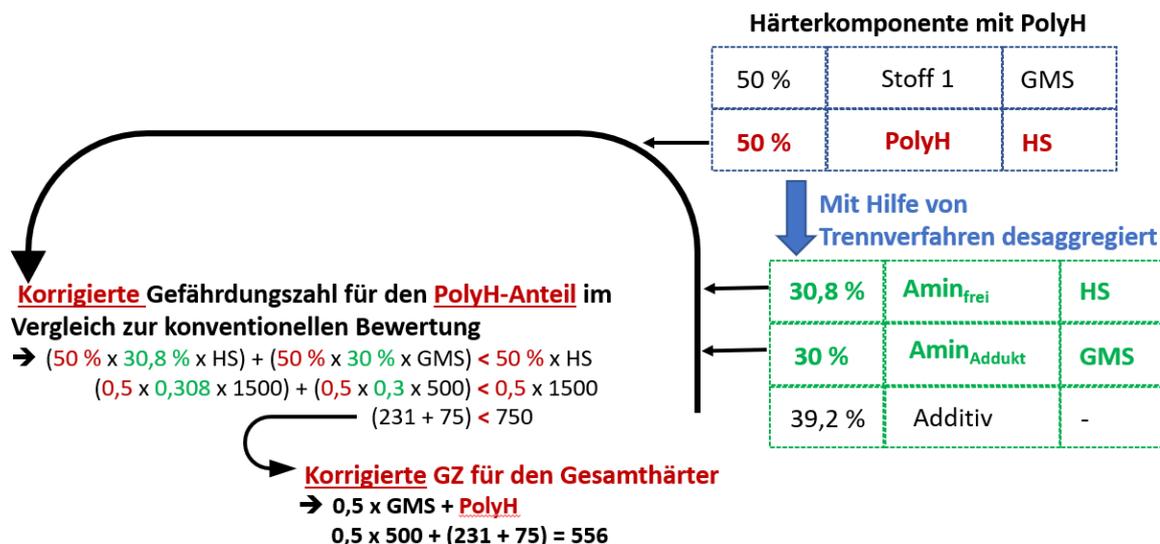


Abbildung 9 Schematisches Vorgehen im EIS-Gemischerechner bei der verbesserten Bewertung einer Härterkomponente mit Präpolymeranteil (PolyH)

Quantitative Aussagen hier nur exemplarisch dargestellt. Die 50 % PolyH im Härter sind wie folgt zusammengesetzt: x + y + z % Anteile (numerische Werte eines Beispielprodukts, dessen Additiv keine sensibilisierende Wirkung besitzt und dessen Aminanteil der Kategorie HS auf Basis von Daten zugeordnet wurde bzw. in anderen Fällen auf Basis unzureichender Daten).

Somit wäre eine erste Möglichkeit der verbesserten Bewertung die Eingabe der einzelnen Bestandteile anstelle der Präpolymerkomponente gesamt. Dazu muss jedoch händisch der Anteil des Propolymers am Härter mit dem Anteil des Bestandteils am Präpolymer multipliziert werden. Dieser Wert wird dann in den Gemischerechner eingetragen und mit der entsprechenden sensibilisierenden Wirkstärke verknüpft. Wird anstelle der Rechnung mit 45 % HS für das Präpolymer, die differenzierte Bewertung anhand der Anteile durchgeführt ergibt sich eine niedrigere Gefährdungszahl. Eine Differenzierung von Produkten ist somit möglich.

Theoretisch ist das adduktierte Amin weniger reaktiv und somit weniger stark sensibilisierend als das jeweilige freie Amin. Wo aber der Schwellenwert für diese geringere sensibilisierende Wirkstärke bei den einzelnen Addukten liegt, kann nicht allgemeingültig gesagt werden. Wurde aber die sensibilisierende Wirkstärke eines adduktierten Amins bereits bewertet, kann die oben beschriebene differenzierte Bewertungsstrategie durchgeführt werden.

Ziel der vorliegenden In-vitro-Testung war dazu beizutragen, allgemeingültige Regeln zu identifizieren, bei denen von einer geringeren sensibilisierenden Wirkstärke des Präpolymers (also dem PolyH) ausgegangen werden kann. Entsprechend muss nicht jedes theoretisch mögliche Präpolymer getestet werden und eine Differenzierung zwischen Produkten im Gemischerechner wäre zu erreichen. Dies ist wiederum ein Anreiz für die Entwickler weniger stark sensibilisierende Kombinationen auf deren technische Eignung zu prüfen und ggfs. auf den Markt zu bringen.

Anhand zweier Präpolymere, welche auf DGEBA und dem Isophorondiamin basieren, wird im Folgenden eine solche nun differenzierte Bewertung schematisch vorgestellt und diskutiert (siehe Tabelle 7). Die Zusammensetzung und Daten des zweiten IPD-Präpolymers wurden

FoBiG vertraulich zur Verfügung gestellt. Aus diesem Grund erfolgt eine allgemeine Benennung:

- PolyH low = IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (DBC-20-B4) aus In-vitro-Testung
- PolyH high = IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH mit höherem Gehalt an Amin_{Addukt} (Zusammensetzung im Detail ist vertraulich)

Tabelle 7 Übersicht der ermittelten Ergebnisse im Gemischerechner für Härterkomponenten mit unterschiedlichen Präpolymeren

	PolyH high - NEU	PolyH low - NEU	PolyH high - ALT	PolyH low - ALT	Kommentar
GZ final	1619	2251	3000	3750	Differenz ~ 600/750
Multiplikator Ätzw.	2,75	3,24	5	5	Starker Einfluss
GZ ohne Ätzw.	589 (Kl. III)	695 (Kl. IV)	600 (Kl. III)	750 (Kl. IV)	Ohne „Ätzw.“ sogar Klassenunterschied
∑ HS-Stoffe [%]	vertraulich	39	25	70	
∑ GMS-Stoffe [%]	vertraulich	43	75	30	

NEU = Auswertung gemäß dem verbesserten Schema in Abbildung 9, ALT = Auswertung gemäß dem Schema in Abbildung 8; GZ: Gefährdungszahl errechnet im Gemischerechner, Ätzw. = Faktor, welcher in die GZ eingerechnet wird für den als verstärkend wirkende Ätzwirkung (H314) von Substanzen; HS-Stoffe: Stoffe, denen eine hohe sensibilisierende Wirkstärke zugeschrieben wird, GMS-Stoffe: Stoffe, denen eine geringe bis mäßige sensibilisierende Wirkstärke zugeschrieben wird

Aus Tabelle 7 wird ersichtlich, dass eine Differenzierung der sensibilisierenden Wirkstärke zwischen den beiden IPD-Präpolymeren (PolyH high und PolyH low) mit beiden Bewertungen möglich ist (ALT und NEU, siehe Zeile GZ final). Die Neubewertung liefert jedoch wesentlich differenziertere Ergebnisse (siehe Zeile Multiplikator Ätzw. und ∑HS-Stoffe und ∑GMS-Stoffe).

Der Multiplikator Ätzwirkung hat einen starken Einfluss auf die finale Gefährdungszahl. In allen Fällen wird immer die höchste Gefährdungsklasse VI (siehe Abbildung 7) erreicht. Wird dieser Faktor nicht berücksichtigt, ergäben sich für die verschiedenen Präpolymere sogar Klassenunterschiede (siehe Zeile GZ ohne Ätzw.).

Die numerischen Unterschiede sind stark durch die Sättigungsgrenze (40 %) definiert. Der Rechnung im EIS-Gemischerechner liegt die Annahme zugrunde, dass „die Sensibilisierung mit zunehmender Menge (Konzentration einer Substanz im Gemisch und auf der Haut) zunimmt. Es ist jedoch auch plausibel, dass diese Zunahme nicht linear von kleinsten Mengen bis zu 100% erfolgt“ (Heine et al., 2016). Die Datenlage für die 40 %-Grenze, bei der nur noch eine geringe Steigung angenommen wird, ist eine erste pragmatische Setzung, die auf wenigen Daten beruht. Insgesamt konnten aber keine neueren Daten identifiziert werden, welche dieser Setzung widersprechen bzw. eine bessere Setzung erlauben.

Rein technisch kann die Bewertung bei Kenntnis einer Zusammensetzung insoweit umgesetzt werden, dass den händisch errechneten Anteilen der jeweilige Inhaltsstoff eines polyH (Amin_{frei}, Lösemittel und Amin_{Addukt}) zugeordnet wird. In der, die Eingabe erleichternden, Inhaltsstoffliste (EIS-Liste) dürften die relevanten Bestandteile Amin_{frei} (d.h. monomere Amine) und auch die gängigen Lösemittel zur Auswahl enthalten sein. Fehlen werden Einträge

für die adduktieren Aminbestandteile, diese können manuell eingegeben werden²⁴ oder es könnte zukünftig Platzhaltereinträge in der EIS-Liste enthalten sein (d.h. Amin_{Addukt} GMS jeweils mit und ohne die Verknüpfung zur Berechnung beeinflussenden Ätzwirkung eines Stoffes).

Zwischenergebnis für die Berücksichtigung der Erkenntnis im Gemischerechner (d.h. Bewertung der Härterkomponente):

Wie bereits unter 4.2.6.1 beschrieben, bestätigen die experimentellen Ergebnisse zu den Härter-Gemischen und zu den Präpolymeren die grundsätzlichen Annahmen im Gemischerechner. Die Setzungen scheinen anwendungsbezogen, eine Adjustierung ist nicht notwendig. Ein Nachteil an der bisherigen Software-Umsetzung des Gemischerechners ist, dass die Bewertung nach dem neuen Schema aktuell nur händisch umsetzbar ist.

²⁴ Siehe FAQ „Wie trage ich einen Stoff in das Rechnerformular ein, der nicht in der EIS-Stoffliste enthalten ist?“ im EIS-Gemischerechner, <https://www.eis-epoximixrechner.de/faq/>

Es ist ferner zu prüfen, ob die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse auf andere Härterzusammensetzungen ohne Testung aller möglichen Präpolymere generalisierbar sind. Für die Beantwortung dieser Frage und die Diskussion einer möglichen pragmatischen Vorgehensweise werden Ergebnisse aus dem aktuellen Forschungsvorhaben zusammen mit Ergebnissen aus Vorgängerprojekten und vertraulichen Industriedaten in Tabelle 8 präsentiert.

Tabelle 8 Ergebnisse zur sensibilisierenden Wirkstärke von Präpolymeren und vergleichbaren Härterkomponenten und deren Zusammensetzung

Projekt	Stoffname	Zusammensetzung				Wirkstärke	Experimentelle Ergebnisse
		Polymer [%]	Amin _{frei} [%]	Wirkstärke des Amins	Lösemittel (LM)		
FP-384	ipox EH 2240; MXDA/ACN Addukt	hoch	niedrig	1A		1B wenige Daten: U (- → GMS)	LLNA: EC3 Wert > 10 % (w/v) KeratinoSens: negativ
FP-451	Polyamidoamin – Rest TETA < 1%	98	< 2	1A und 1B		1B	GARD™
FP-384	IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH*	>> 30	< 20	1A	<< 50	1B wenige Daten: U (- → GMS)	LLNA: EC3 Wert > 10 % (w/v) KeratinoSens: negativ
Vertraulich	IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	> 30	< 20	1A	<< 50	1B	Vertrauliche Daten
FP-451	IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	30	30,8	1A	39,2	1A	GARD™
FP-451	TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	30	30,8	1B	39,2	1B	GARD™
FP-451	1,3 BAC-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH	30	30,8	U	39,2	1A	GARD™ (Daten Amin - GPMT negativ und biov hoch; Pro-Hapten)
FP-451	Tetraethylen-pentamin (TEPA)	0	99	1B		1B	GARD™ bzw. gesamte Datenlage

Biov. = Bioverfügbarkeit; U (-→ GMS) = Wirkstärkenbewertung gemäß dem Ranking aus Vorgängerprojekten (siehe Heine et al., 2016), die Kategorie U bedeutet dabei, dass zu wenige Daten vorhanden für eine Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke vorhanden sind, (-→ GMS) bedeutet, dass die wenigen verfügbaren Daten jedoch auf eine geringe bis mäßige sensibilisierende Wirkstärke hinweisen. * Das in FP-384 getestete IPD-Polymer DBC-15-01 ist nicht identisch mit den registrierten REACH Addukten (CAS-Nr. 38294-64-3, UVCB in REACH registriert) gemäß der REACH VO. Für das IPD-Polymer DBC-15-01 liegen dem Hersteller HPLC Analysen vor, welche belegen, dass es sich gemäß der unter REACH-VO geltenden Regeln um ein Polymer handelt. Die unter REACH registrierten IPD-Addukte sind keine Polymere. (persönliche Kommunikation Herr Karl, MC Bauchemie im September 2017).

Nach dem Standardvorgehen wäre jeder Inhaltsstoff ohne Daten und mit sensibilisierender Wirkung (H317) als ein Stoff mit hoher sensibilisierender Wirkstärke (HS) zu betrachten (siehe Heine et al., 2016; Kategorie Unbekannt (U)). Um von diesem Standard auch ohne spezifische

Testung abzuweichen und um zu einer besseren Bewertung zu gelangen, werden ausgehend von den differenzierten Ergebnissen mit den drei unterschiedlichen IPD-Präpolymeren und dem TEPA Präpolymer die folgenden pragmatischen Regeln vorgeschlagen.

- I. $> 30\% \text{ Amin}_{\text{Addukt}}$ **UND** $< 10\% \text{ Amin}_{\text{frei}}$ der Wirkstärke HS („stark sensibilisierend“)
- II. $> 30\% \text{ Amin}_{\text{Addukt}}$ **UND** $< 30\% \text{ Amin}_{\text{frei}}$ der Wirkstärke GMS („gering bis mäßig sensibilisierend“)
- UND** zusätzlich für I und II - das Lösemittel im Präpolymer weist keine sensibilisierende Wirkung auf

Abbildung 10 Pragmatische Regeln zur Bewertung von Präpolymeren als GMS im EIS-Gemischerechner ohne stoffspezifische Testdaten

Bei Erfüllung einer dieser Regeln kann pragmatisch für die Bewertung im Gemischerechner angenommen werden, dass das entsprechende Präpolymer nur eine geringe bis mäßige sensibilisierende Wirkstärke besitzt (**Tendenz GMS, Skin Sens 1B**). Diese Annahme gilt ohne Präpolymer-spezifische Testdaten. Diese Regeln sind zunächst nur auf die PolyH definierten Präpolymere (also Bisphenol A + Epichlorhydrin in Lösemittel plus Amin) anzuwenden, basierend auf der bisherigen Datenbasis. In allen anderen Fällen ist wie im bisherigen Standardvorgehen von einer starken Potenz (HS) auszugehen, sofern keine Daten vorliegen, die das Gegenteil belegen.

Ausgehend von dieser limitierten Datenbasis ist klar, dass diese pragmatischen Regeln mit einer gewissen Unsicherheit belegt sind. Diese können aber durch die Anwendung und ggfs. in-house Testungen bei den Herstellern im Laufe der Zeit nochmals verfeinert werden. Es ist ein erster Schritt und stellt einen Anreiz für die weitere Entwicklung besserer Systeme dar.

Positiv ist, die bisherige Softwareanwendung des EIS-Gemischerechners kann in seiner jetzigen Form weiter genutzt werden und ist entsprechend direkt einsetzbar. An den konservativen Setzungen des Gemischerechners allgemein ändert sich nichts. Die neuen Regeln erlauben lediglich eine Abweichung vom Standardvorgehen.

Rein technisch kann die Bewertung bei Kenntnis einer Zusammensetzung des polyH-Anteile und somit der Anwendungsmöglichkeit der obigen Regeln direkt im Gemischerechner erfolgen. Allerdings gibt es nicht für jedes Präpolymer einen entsprechenden Eintrag in der, die Eingabe erleichternden, Inhaltsstoffliste (EIS-Liste). Es kann jedoch ein Eintrag manuell generiert werden²⁵ oder es könnte zukünftig Platzhaltereinträge in der EIS-Liste enthalten sein (z.B. DGEBA-Präpolymer mit GMS jeweils mit und ohne die Verknüpfung zur Berechnung beeinflussenden Ätzwirkung).

Außerdem sind wahrscheinlich auch polymere Bestandteile in der Liste geführt, deren genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist und die auf Basis fehlender Daten zunächst mit der hohen sensibilisierenden Wirkstärke belegt wurden (Kategorie Unbekannt, Standardvorgehen Bewertung mit HS). Ist deren Zusammensetzung einem Anwender des Gemischerechners bekannt, können natürlich die in Abbildung 10 genannten Regeln geprüft werden und eine verbesserte Bewertung ist möglich.

²⁵ Siehe FAQ „Wie trage ich einen Stoff in das Rechnerformular ein, der nicht in der EIS-Stoffliste enthalten ist?“ im EIS-Gemischerechner, <https://www.eis-epoximixrechner.de/faq/>

Sieht man sich die Einstufungsgrenzen bei der Gemiscebewertung in der europäischen CLP-Verordnung an (siehe Tabelle 3.4.5 in der Verordnung EC (Nr.) 1272/2008 (EU, 2008)²⁶) findet man wesentlich konservativere Vorgaben:

- das Vorhandensein eines Stoffes von $\geq 0,1$ % mit Skin Sens 1A führt zur Einstufung des Gemisches mit Skin Sens 1 und
- das Vorhandensein eines Stoffes von ≥ 1 % mit Skin Sens 1B führt zur Einstufung des Gemisches mit Skin Sens 1.

Entsprechend könnte man den in Abbildung 10 präsentierten pragmatischen Regeln ein zu geringes Schutzniveau vorwerfen. Dem steht das Argument gegenüber, dass wir mit dieser verfeinerten Bewertung nur einen gewissen Anteil des Härters bewerten, zusätzlich werden immer noch die Inhaltsstoffe der Harzkomponente und die restliche Inhaltsstoffe des Härters und ggfs. Füllstoffe für die Bewertung betrachtet. Diese Teile werden weiterhin wie bisher bewertet und es kommt nie zu einer Aberkennung der sensibilisierenden Wirkung von Epoxidharzgemischen in ihrer ungemischten Form. Es erlaubt aber eine differenziertere Bewertung von Bestandteilen und führt so eventuell zu verbesserten Rezepturen mit weniger sensibilisierender Potenz.

Der Vergleich von experimentellen Daten zu den DGEBA-Präpolymeren hat die Ableitung der pragmatischen Regeln erlaubt. Es bleibt die Frage, ob diese Regeln nun auch auf andere präpolymerisierten Härterkomponenten anzuwenden sind. Die mechanistischen Überlegungen zur geringeren Reaktivität legen dies nahe und auch das Ergebnis für das im Forschungsvorhaben getestete Polyamidoamin bestätigt diese Vermutung (Skin Sens 1B im GARD, siehe Tabelle 4). Die Basis für ein Polyamidoamin als Härterkomponente bildet eine Fettsäure plus freies Amin. Die technische Herstellung ist sehr genau definiert und basierend auf stöchiometrischen Berechnungen sind entsprechend genaue Mischungen möglich. Der Überschuss an freiem Amin ist meist sehr gering (< 1 %) und es werden keine Lösemittel mit ggfs. sensibilisierenden Eigenschaften benötigt. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die oben genannten Regeln ebenfalls auf die Polyamidoamine ausgeweitet werden dürfen.

Für Polymere, deren Basis noch anderer Natur als die oben genannten sind, wird angenommen, dass die Regeln möglicherweise ebenfalls anzuwenden wären. Ohne aber zumindest einen Testbefund, der dies grundsätzlich beweist, wird zunächst davon abgesehen diese Regeln zu generalisieren. Auf Basis von zusätzlichen Informationen kann dies jedoch zu einem späteren Zeitpunkt vorstellbar sein. Außerdem wurde im AK EIS die Frage nach den möglichen Polymerarten, die technisch denkbar für den Einsatz in Epoxidharzsystemen sind, noch nicht abschließend beantwortet. Dies kann zukünftig zu weiteren Änderungen führen.

Der EIS-Gemischerechner selbst ist mit all den aufgezeigten Unsicherheiten auf deren Basis die Rechnungen beruhen im Sinne des Vorsorgegedankens und liefert entsprechend eher konservative Ergebnisse. Verfolgt man für eine Bewertungen an jeder Variablen immer den konservativsten Ansatz, so führt dies zu praxisfernen Bewertungen und wird keine Akzeptanz bei den avisierten Zielgruppen (UVTs, Hersteller von Epoxidharz, möglicherweise auch Anwender von Epoxidharzsystemen) finden. Aus diesem Grund sind die (möglicherweise weniger konservativen) pragmatischen Regeln für die DGEBA-Präpolymere und deren Ausweitung auf die Polyamidoamine zielführend für die weitere Verwendung des EIS-Gemischerechners und den sich daraus ergebenden Erkenntnisgewinn.

²⁶ In der aktuellen Fassung, konsolidierte Fassung vom 10.05.2021

Schlussfolgerung:

Die Kombination der Ergebnisse aus der In-vitro-Testung in diesem Forschungsvorhaben, Ergebnissen aus Vorgängerprojekten und vertraulichen Industriedaten konnten pragmatische Regeln für die Bewertung der Präpolymere in Härtern abgeleitet werden. Diese können, bei Kenntnis der genauen Präpolymerzusammensetzung, zu einer differenzierten Bewertung von Produkten im EIS-Gemischerechner führen. Dies stellt einen Anreiz für die Entwickler von Epoxidharzsystemen dar, verbesserte Rezepturen zu entwerfen und auf den Markt zu bringen und ist im Sinne des Arbeitsschutzes.

4.3 Zusammenfassung**Hintergrund und Vorarbeiten:**

Inhaltsstoffe von Epoxidharzsystemen sind häufige Auslöser allergischer Hauterkrankungen bei Arbeitern aus verschiedenen Branchen (Allergische Kontaktdermatitis). Bereits mehrere DGUV-geförderte Forschungsvorhaben (Heine et al., 2012; 2016) und auch die Arbeit des Arbeitskreis Epoxidharz-Inhaltsstoffe (AK EIS; Dilger und Heine, 2018; Hassauer und Heine, 2019) befassen sich damit diese Inhaltsstoffe gemäß ihrer sensibilisierenden Wirkstärke zu charakterisieren und eine Rangfolge aufzustellen. Das übergeordnete Ziel dieser Projekte ist es, mit der Wirkstärkencharakterisierung den Herstellern bzw. den Formulierern von Epoxidharzsystemen ein Werkzeug zur Erstellung von verbesserten Rezepturen und den Fachkräften für Arbeitssicherheit von Betrieben mit Epoxidharzanwendungen eine Hilfestellung für Substitutionsmöglichkeiten zu geben. Es soll möglich werden, die stark sensibilisierenden Inhaltsstoffe durch weniger stark sensibilisierende Inhaltstoffe zu ersetzen (falls technisch möglich).

Das aktuelle Forschungsprojekt verfolgte dazu mehrerer Ziele. Das oberste Ziel ist es Datenlücken für die Bewertung sogenannter Präpolymere zu schließen. Die Präpolymere stellen eine technische Neuerung dar, die erfolgsversprechend ist, um eine Senkung der Allergiepotenz von Epoxidharzsystemen zu erreichen.

Im Zuge der Bewertung von REACH registrierten Stoffen wurde deutlich, dass die Bewertung, wie sie anhand der formalen Kriterien in REACH durchgeführt werden ggfs. nicht ausreicht, um die tatsächliche Wirkstärke der mittlerweile verwendeten Addukte und Präpolymere darzustellen. In REACH genügt beispielsweise der Übertrag der sensibilisierenden Eigenschaft und der Wirkstärke der zugrunde liegenden Monomere. Wie aber bereits aus dem Vorläuferprojekt deutlich und nun weiter untersucht wurde, entspricht dies nicht der tatsächlichen Wirkpotenz mancher Präpolymere. Für die Bewertung in REACH ist ein konservativer Ansatz sinnvoll (Einstufung als Skin Sens 1 bereits ab einer Konzentration von $\geq 0,1$ % eines Bestandteils im Gemisch, der mit Skin Sens 1A eingestuft ist bzw. von ≥ 1 % im Fall der Einstufung von Skin Sens 1B, siehe Tabelle 3.4.5 in der Verordnung EC (Nr.) 1272/2008 (EU, 2008)²⁷). Im Sinne des Arbeitsschutzes ist jedoch eine verbesserte Bewertung auf Basis eines vertieften Wissens der tatsächlichen Eigenschaften erforderlich. Aus diesem Grund wurden im vorliegenden Forschungsvorhaben die In-Vitro-Testung bestimmter Präpolymere und exemplarischer Härter-Gemische adressiert.

²⁷ In der aktuellen Fassung, konsolidierte Fassung vom 10.05.2021

Im AK EIS wurde als Vorarbeit zum Projekt ein Set an Einzelstoffen, Präpolymeren und Gemischen identifiziert, zu denen die Datenlage derzeit mangelhaft ist. Um Datenlücken zu schließen, wurden auf dieser Basis Inhaltsstoffe, die den folgenden Stoffgruppen²⁸ zugeordnet werden können, auf ihre sensibilisierende Wirkung und Wirkstärke hin untersucht.

- i) Ein Einzelstoff,
- ii) drei Präpolymere (jeweils auf Basis von Diglycidylether von Bisphenol A (DGEBA)), und
- iii) ein Polyamidoamin (auf Basis C18-ungesättigter Dimer-Fettsäuren).

Als In-vitro-Testsystem der neuesten Generation wurde im vorliegenden Projekt der „Genomic Allergen Rapid Detection“-Test (GARD™) eingesetzt. Der GARD™skin identifiziert die sensibilisierende Wirkung eines Stoffes und anschließend kann mittels GARD™potency dessen sensibilisierende Wirkstärke ermittelt werden.

Ergebnisse:

- Eignung des Testsystems:

Das hier angewandte In-vitro-Testsystem, der GARD™skin und GARD™potency sind adäquat für die hier untersuchten Inhaltsstoffe. Die In-vitro-Testsysteme haben erwartungsgemäß mit den gleichen Problemen bei der (semi-)quantitativen Wirkstärkenbestimmung umzugehen, wie sie in ähnlichem Ausmaß auch bei den früher durchgeführten In-vivo-Studien im Vergleich zu Humanbefunden vorlagen. Für alle hier durchgeführten In-vitro-Testungen waren die Messung beeinflussenden Faktoren (z.B. Löslichkeit und Zytotoxizität) ausreichend kontrolliert. Durch die Verwendung alternativer Auswertungsmodelle konnten verlässliche Aussagen für die Wirkstärkenbewertung der getesteten Inhaltsstoffe getroffen werden; eine Differenzierung der Potenz war möglich.

- Potenzzuordnung auf Basis der In-vitro-Testung:

Drei Testmaterialien werden der Kategorie Skin Sens 1B (Stoffe mit geringer sensibilisierender Potenz) zugeordnet. Dies trifft auf die folgenden Testmaterialien zu:

- Der Einzelstoff (TEPA; monomeres Amin)
- TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH und
- Polyamidoamin (Epamide 405, < 2 % freies Amin) bestimmt.

Die zwei weiteren DGEBA-Präpolymere wurden in die Kategorie Skin Sens. 1A eingeordnet. Dies sind:

- 1,3 BAC- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH und
- IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH.

Die Ergebnisse sind mechanistisch plausibel.

²⁸ Und zwei definierte Härter-Gemische, die jeweils als Beispiel für eine gesamte Härterkomponente eines theoretischen Epoxidharzproduktes dienen. Auf die Ergebnisse wird im vorliegenden Bericht teilweise Bezug genommen (Grundsatzprüfung für die Setzungen im Gemischerechner), jedoch werden sie nicht ausführlich diskutiert. Auf Originalstudienberichte wird im Anhang verwiesen und als ergänzendes Material geliefert. Ergebnis Härter Gemisch 1 mit 50 % BzOH (CAS-Nr. 100-51-6), 5 % Salicylsäure (CAS-Nr. 69-72-7), 35 % IPD (CAS-Nr. 2855-13-2), 10 % MXDA (CAS-Nr. 1477-55-0) → Skin Sens 1B, Härter Gemisch 2 mit 50 % BzOH, 5 % Salicylsäure, 30 % TEPA (CAS-Nr. 112-57-2), 15 % Jeffamine D230 (CAS-Nr. 9046-10-0)

- Übertragbarkeit der Ergebnisse – abgeleitete Bewertungsregeln:

Die Kombination der Ergebnisse aus der In-vitro-Testung in diesem Forschungsvorhaben, mit Ergebnissen aus Vorgängerprojekten und vertraulichen Industriedaten erlauben die Ableitung pragmatischer Regeln für die Bewertung der DGEBA-Präpolymere in Härtern von Epoxidharzprodukten.

- I. > 30 % Amin_{Addukt} **UND** < 10 % Amin_{frei} der Wirkstärke HS („stark sensibilisierend“)
- II. > 30 % Amin_{Addukt} **UND** < 30 % Amin_{frei} der Wirkstärke GMS („gering bis mäßig sensibilisierend“)
- UND** zusätzlich für I und II - das Lösemittel im Präpolymer weist keine sensibilisierende Wirkung auf

Erfüllt ein Stoff eine dieser Regeln, so kann auch ohne stoffspezifische Daten davon ausgegangen werden, dass dieses Material nur eine geringe bis mäßige Wirkstärke (GMS) innehat. In allen anderen Fällen ist von einer starken Potenz (HS) auszugehen, sofern keine Daten vorliegen, die das Gegenteil belegen. Die Regeln sind für DGEBA-Präpolymere und Polyamidoamine anzuwenden. Ob diese Regeln ggfs. auf andere Präpolymertypen (z.B. andere Harzbasis) ausgedehnt werden können, erfordert die Auswertung zusätzlicher experimenteller Daten und wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts nicht geprüft.

- Praxisrelevanz und Umsetzbarkeit:

Die experimentellen Ergebnisse zu den Härter-Gemischen und zu den Präpolymeren bestätigen die grundsätzlichen Annahmen im EIS-Gemischerechner, einer Softwareanwendung, die in vorangegangenen Projekten und im AK EIS entwickelt wurde.

Die entwickelten pragmatischen Regeln können, bei Kenntnis der genauen Präpolymerzusammensetzung, in diesen EIS-Gemischerechner integriert und zu einer differenzierten Bewertung von Produkten in Bezug auf ihre sensibilisierende Wirkung herangezogen werden.

Die Unfallversicherungsträger können den EIS-Gemischerechner ihren Mitgliedsbetrieben empfehlen. Die Fachkräfte für Arbeitssicherheit von Betrieben mit Epoxidharzanwendungen können unter Anwendung der neuen Regeln Substitutionsmöglichkeiten von Einzelstoffen und Präpolymeren in Epoxidharzsystemen identifizieren und entsprechende Empfehlungen geben. Der herstellenden Industrie bzw. den Formulierern von Epoxidharzsystemen können die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes in Verbindung mit dem EIS-Gemischerechner als Werkzeug zur Entwicklung weniger stark sensibilisierender Systeme dienen. Differenzierte Bewertungen von Produkten stellen einen Anreiz für die Entwickler von Epoxidharzsystemen dar, verbesserte Rezepturen, die weniger stark sensibilisierend sind, zu entwerfen und auf den Markt zu bringen. Dies ist im Sinne Arbeitsschutzes.

**5 AUFLISTUNG DER FÜR DAS VORHABEN RELEVANTEN
VERÖFFENTLICHUNGEN, SCHUTZRECHTSANMELDUNGEN UND
ERTEILTEN SCHUTZRECHTE VON NICHT AM VORHABEN BETEILIGTEN
FORSCHUNGSSTELLEN**

KEINE

6 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE HINSICHTLICH DES FORSCHUNGSZWECKS/-ZIELS, SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das erste Ziel des Forschungsvorhabens, die **Schließung relevanter Datenlücken** für die Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke von Präpolymeren, konnte durch die gezielte In-vitro-Testung erreicht werden. Die bereits vorliegende Bewertung der sensibilisierenden Wirkstärke des getesteten Einzelstoffes wurde verifiziert und für exemplarische Präpolymere (drei DGEBA-Präpolymere und ein Polyamidoamin) wurden substanzspezifische Daten generiert.

Die Ergebnisse der exemplarisch getesteten DGEBA-Präpolymere in Kombination mit Ergebnissen aus Vorgängerprojekten und vertraulichen Industriedaten haben es darüber hinaus ermöglicht, das zweite Forschungsziel, **die Übertragung der Erkenntnisse auf ungetestete Präpolymere**, zu erreichen. Es konnten zwei pragmatische Regeln aufgestellt werden, welche zu einer verbesserten Bewertung von DGEBA-Präpolymeren und den damit hergestellten Epoxidharzsystemen führen.

Die mechanistischen Überlegungen zur geringeren Reaktivität legen nahe, dass die für die DGEBA-Präpolymere abgeleiteten Regeln auch auf andere präpolymerisierten Härterkomponenten anzuwenden sind. Dies wurde im Forschungsvorhaben für das getestete Polyamidoamin bestätigt. Die technische Herstellung von Polyamidoaminen ist sehr genau definiert, der Überschuss an freiem Amin ist meist sehr gering ($< 1\%$) und es werden keine Lösemittel mit ggfs. sensibilisierenden Eigenschaften benötigt. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die oben genannten Regeln ebenfalls auf die Polyamidoamine ausgeweitet werden dürfen.

Ob diese Regeln ggfs. auf andere Präpolymertypen (andere Harzbasis) ausgedehnt werden können, erfordert die Auswertung zusätzlicher experimenteller Daten und wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts nicht geprüft.

Das letzte Ziel dieses Forschungsvorhabens war, die erzielten Testergebnisse und generellen Regeln in entsprechende **praxisorientierte Entscheidungshilfen** für die Stoffselektion/ -substitution umzusetzen. Die Ergebnisse zu den Härter-Gemischen konnten die generellen Annahmen des bereits bestehenden Epoxidharz-Inhaltsstoffe-Gemischerechners (EIS-Gemischerechner) bestätigen („proof-of-concept“). Die entwickelten pragmatischen Regeln können, bei Kenntnis der genauen Präpolymerzusammensetzung, im EIS-Gemischerechner Eingang finden und zu einer differenzierten Bewertung von Produkten führen. Der EIS-Gemischerechner ist ein einsatzfähiges Werkzeug für die praxisnahe Anwendung zur Beurteilung von Epoxidharzprodukten durch **die Fachkraft für Arbeitssicherheit von Betrieben mit Epoxidharzanwendungen**. Auf Basis von Berechnungen im EIS-Gemischerechner können ggfs. Substitutionsmöglichkeiten gefunden werden. Außerdem stellen verbesserte Bewertungen von Produkten im EIS-Gemischerechner **einen Anreiz für die Entwickler** von Epoxidharzsystemen dar, verbesserte Rezepturen zu entwerfen und auf den Markt zu bringen. Dies ist im Sinne des Arbeitsschutzes.

7.1 Vorstellung von Teilergebnissen bei der EUROTOX 2021

In Abstimmung mit der DGUV und nach Zustimmung durch die Mitglieder des AK Epoxidharz-Inhaltsstoffe (AK EIS) wurde eine Kurzzusammenfassung bei den Organisatoren des Europäischen Toxikologenkongresses²⁹ zur Präsentation eingereicht. Der Titel lautet „In vitro assessment of the skin sensitizing potential and potency of epoxy resin monomers and pre-polymer mixtures using the GARD assay.“ Die Zusammenfassung wurde zur Präsentation akzeptiert und wird von H. Gehrke, einem Mitarbeiter der Eurofins BPT Munich GmbH im Rahmen des im September 2021 stattfindenden Kongress als Posterpräsentation vorgestellt.

7.2 Publikation in Fachzeitschrift

Die in diesem Projekt erzielten Erkenntnisse werden in Absprache mit dem durchführenden Labor, Eurofins BPT Munich GmbH, in Form einer englischsprachigen Publikation dem breiten, wissenschaftlichen Publikation zur Verfügung gestellt. Geplant ist eine Publikation in der Fachzeitschrift „Contact dermatitis“³⁰.

Die Publikation wird von Wissenschaftlern der beauftragten Institute gemeinsam verfasst und die Finanzierung durch die DGUV entsprechend ausgewiesen.

Die 1. Einreichung ist innerhalb eines Jahres nach Abschluss des Projekts geplant (bis Ende 1. Quartal 2022).

7.3 Handreichung für die differenzierte Anwendung des Gemischerechners bei der Bewertung von Präpolymeren

Außerdem werden die Ergebnisse dazu verwendet, um eine Handreichung zur verbesserten Bewertung von Präpolymeren im EIS-Gemischerechner bei zusätzlich vorhandener Information zur Zusammensetzung durchführen zu können. Diese Handreichung wird dem AK Epoxidharz-Inhaltsstoffe vorgelegt und von den entsprechenden Experten auf die Verständlichkeit und Praxisorientiertheit hin überprüft. Nach Abstimmung im Arbeitskreis wird die Handreichung als Text in den Gemischerechner integriert. Hier kann er von den registrierten Nutzern (zugänglich für jeden Interessenten nach vorhergehender Anmeldung) als Unterstützung bei der Verwendung des Gemischerechners herangezogen werden.

Die Einreichung eines entsprechenden Textvorschlags wird nach der 10. Sitzung des AK EIS (September 2021) durch FoBiG erfolgen. Nach Abstimmung aller Mitglieder wird mit der Freigabe eines entsprechend veränderten Textes zur Verwendung im Gemischerechner bis zur nächsten Sitzung zu rechnen sein (Frühjahr 2022).

²⁹ <https://www.eurotox2021.com>

³⁰ <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/16000536>

7.4 Anwendung und Überprüfung im Gemischerechner

Von den Mitgliedern des AK EIS sollen zukünftig, falls notwendig unter Geheimhaltung der tatsächlichen Zusammensetzung, weiterer Zusammensetzungen von Präpolymeren oder vergleichbaren Polyamidoaminen an FoBiG übermittelt werden. FoBiG kann hiermit differenzierte Bewertungen im Gemischerechner durchführen und deren Plausibilität überprüfen. Die Ergebnisse werden im AK EIS, der mindestens noch eine Laufzeit bis Ende 2022 (voraussichtlich jedoch bis zum Jahr 2024) hat, vorgestellt und diskutiert. Sollten sich daraus notwendige Anpassungen ergeben werden diese durchgeführt.

Darüber hinaus könnten weitere Polymerarten bestimmt und ggfs. in entsprechenden Tests deren sensibilisierende Wirkstärke überprüft werden, um die hier festgelegten pragmatischen Regeln ggfs. auf weitere Polymerarten auszuweiten.

- Aalto-Korte, K.; Koskela, K.; Pesonen, M. (2020)
Construction workers' skin disorders in the Finnish Register of Occupational Diseases 2005-2016
Contact Dermatitis, 83, 437-441
- Aalto-Korte, K.; Pesonen, M.; Suuronen, K. (2015)
Occupational allergic contact dermatitis caused by epoxy chemicals: occupations, sensitizing products, and diagnosis
Contact Dermatitis, 73, 336-342
- Albrekt, A.S.; Johansson, H.; Börje, A.; Borrebaeck, C.; Lindstedt, M. (2014)
Skin sensitizers differentially regulate signaling pathways in MUTZ-3 cells in relation to their individual potency
BMC Pharmacology & Toxicology, 15:5, 1-12
- Basketter, D.; Beken, S.; Bender, H.; Bridges, J.; Casati, S.; Corvaro, M.; Cuvellier, S.; Hubesch, B.; Irizar, A.; Jacobs, M.N.; Kern, P.; Lamplmair, F.; Manou, I.; Müller, B.P.; Roggeband, R.; Rossi, L.H. (2020)
Building confidence in skin sensitisation potency assessment using new approach methodologies: report of the 3rd EPAA Partners Forum, Brussels, 28th October 2019
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 117, 104767
- Basketter, D.A.; Kimber, I. (2011)
Skin irritation, false positives and the local lymph node assay: a guideline issue?
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 61, 137-140
- Benigni, R.; Battistelli, C.L.; Bossa, C.; Giuliani, A.; Tcheremenskaia, O. (2015)
Alternative toxicity testing: analyses on skin sensitization, ToxCast phases I and II, and carcinogenicity provide indications on how to model mechanisms linked to adverse outcome pathways
Journal of Environmental Science and Health, Part C, 33, 422-443
- Bergal, M.; Puginier, M.; Gerbeix, C.; Groux, H.; Roso, A.; Cottrez, F.; Milius, A. (2020)
In vitro testing strategy for assessing the skin sensitizing potential of "difficult to test" cosmetic ingredients
Toxicology In Vitro, 65, Article 104781
- Brans, R.; Schroder-Kraft, C.; Skudlik, C.; John, S.M.; Geier, J. (2019)
Tertiary prevention of occupational skin diseases: Prevalence of allergic contact dermatitis and pattern of patch test results
Contact Dermatitis, 80, 35-44
- Casati, S.; Aschberger, K.; Barroso, J.; Casey, W.; Delgado, I.; Kim, T.S.; Kleinstreuer, N.; Kojima, H.; Lee, J.K.; Lowit, A.; Park, H.K.; Régimbald-Krnel, M.J.; Strickland, J.; Whelan, M.; Yang, Y.; Zuang, V. (2018)
Standardisation of defined approaches for skin sensitisation testing to support regulatory use and international adoption: position of the International Cooperation on Alternative Test Methods
Archives of Toxicology, 92, 611-617

Corsini, E.; Clewell, R.; Cotgreave, I.; Eskes, C.; Kopp-Schneider, A.; Westmoreland, C.; Alves, P.M.; Navas, J.M.; Piersma, A. (2021)

ESAC Opinion on the Scientific Validity of the GARDskin and GARDpotency Test Methods. ESAC Opinion No. 2021-01 of 8 July 2021

Asturiol Bofill, D., Casati, S. and Viegas Barroso, J.F. editor(s). Publications Office of the European Union, Luxembourg. JRC125963. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC125963>

Corsini, E.; Engin, A.B.; Neagu, M.; Galbiati, V.; Nikitovic, D.; Tzanakakis, G.; Tsatsakis, A.M. (2018)
Chemical-induced contact allergy: from mechanistic understanding to risk prevention
Archives of Toxicology, 92, 3031-3050

Cottrez, F.; Boitel, E.; Auriault, C.; Aeby, P.; Groux, H. (2015)
Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay
Toxicol In Vitro, 29, 787-802

Cottrez, F.; Boitel, E.; Berrada-Gomez, M.-P.; Dalhuchyts, H.; Bidan, C.; Rattier, S.; Ferret, P.-J.; Groux, H. (2020)
In vitro measurement of skin sensitization hazard of mixtures and finished products: Results obtained with the SENS-IS assays
Toxicology In Vitro, 62, Article 104644

Cottrez, F.; Boitel, E.; Ourlin, J.C.; Peiffer, J.L.; Fabre, I.; Henaoui, I.S.; Mari, B.; Vallauri, A.; Paquet, A.; Barbry, P.; Auriault, C.; Aeby, P.; Groux, H. (2016)
SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study
Toxicol In Vitro, 32, 248-260

de Ávila, R.I.; Lindstedt, M.; Valadares, M.C. (2019)
The 21st Century movement within the area of skin sensitization assessment: From the animal context towards current human-relevant in vitro solutions
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 108, Article 104445

de Carvalho, C.M.; Menezes, P.F.C.; Letenski, G.C.; Praes, C.E.O.; Feferman, I.H.S.; Lorencini, M. (2012)
In vitro induction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic preservatives: application of flow cytometry as a complementary analysis by NRU
International Journal of Cosmetic Science, 34, 176-182

Dilger, M.; Heine, K. (2018)
Datenlage Hautsensibilisierung für 18 Epoxidharzinhaltsstoffe (Neustoffe)
Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG), Freiburg. Erstellt im Auftrag des Arbeitskreis Epoxidharzinhaltsstoffe (AK EIS)

EC, European Commission (2016)
COMMISSION REGULATION (EU) 2016/1688 of 20 September 2016 amending Annex VII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards skin sensitisation
Official Journal of the European Union, L 255/14, 3p. <http://eur-lex.europa.eu>

EC, European Community (2008)

REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 *Official Journal of the European Union*, L 353, 1-1355. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1272/oj>

Esser, P.R.; Martin, S.F. (2017)

Pathomechanisms of contact sensitization
Current Allergy and Asthma Reports, 17, 83ff

EU, Europäische Union (2008)

Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006
Amtsblatt der Europäischen Union, L 353/1, 1-1355

Fitzpatrick, J.M.; Roberts, D.W.; Patlewicz, G. (2018)

An evaluation of selected (Q)SARs/expert systems for predicting skin sensitisation potential
SAR and QSAR in Environmental Research, 29, 439-468

Fukuyama, T.; Ueda, H.; Hayashi, K.; Tajima, Y.; Shuto, Y.; Kosaka, T.; Harada, T. (2008)

Sensitizing potential of chromated copper arsenate in local lymph node assays differs with the solvent used
Journal of Immunotoxicology, 5, 99-106, zitiert nach ICCVAM, 2009

Gradin, R.; Johansson, A.; Forreryd, A.; Aaltonen, E.; Jerre, A.; Larne, O.; Mattson, U.; Johansson, H. (2020)

The GARDpotency assay for potency-associated subclassification of chemical skin sensitizers- rationale, method development, and ring trial results of predictive performance and reproducibility
Toxicological Sciences, 176, 423-432

Grundstrom, G.; Borrebaeck, C.A.K. (2019)

Skin Sensitization Testing-What's Next?
Int J Mol Sci, 20, 666

Hassauer, M.; Heine, K. (2019)

Datenlage Hautsensibilisierung für 30 Epoxidharzinhaltsstoffen (U-Stoffe der "Allergenliste")
Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG), Freiburg. Erstellt im Auftrag des Arbeitskreis Epoxidharzinhaltsstoffe (AK EIS)

Heine, K.; Kalberlah, F.; Hassauer, M.; Geier, J.; Lessmann, H. (2012)

Ranking von Stoffen in Epoxidharzsystemen aufgrund ihrer sensibilisierenden Wirkstärken (FP-0324) erstellt im Auftrag der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV), Sankt Augustin;
<http://www.bgbau.de/gisbau/fachthemen/epoxi/downloads/Gesamtbericht.pdf>.
http://www.dguv.de/ifa/forschung/projektverzeichnis/ff-fp_0324.jsp

- Heine, K.; Kalberlah, F.; Hassauer, M.; Geier, J.; Lessmann, H. (2016)
Vergleichende gesundheitliche Bewertung von Epoxidharzsystemen unter Berücksichtigung sensibilisierender Wirkstärke. Projekt-Nr. FF-FP 0384
im Auftrag der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV), Sankt Augustin. In Zusammenarbeit mit dem Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK), Institut an der Universität Göttingen. <http://www.dguv.de/ifa/forschung/projektverzeichnis/ff-fp0384.jsp>
- Hoffmann, S.; Kleinstreuer, N.; Alépée, N.; Allen, D.; Api, A.M.; Ashikaga, T.; Clouet, E.; Cluzel, M.; Desprez, B.; Gellatly, N.; Goebel, C.; Kern, P.S.; Klaric, M.; Kühnl, J.; Lalko, J.F.; Martinozzi-Teissier, S.; Mewes, K.R.; Miyazawa, M.; Parakhia, R.; van Vliet, E.; Zang, Q.; Petersohn, D. (2018)
Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database
Critical Reviews in Toxicology, 48, 344-358
- Ivanova, H.; Dimitrova, G.; Kuseva, C.; Schultz, T.W.; Mekenyan, O.G. (2020)
Modeling hazard assessment of chemicals based on adducts formation. I. A basis for inclusion of kinetic factors in simulating skin sensitization
Computational Toxicology, 15, 100130
- Johansson, H.; Albrekt, A.S.; Borrebaeck, C.A.; Lindstedt, M. (2013)
The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers
Toxicol In Vitro, 27, 1163-1169
- Johansson, H.; Gradin, R. (2017)
Skin sensitization: challenging the conventional thinking - A case against 2 out of 3 as integrated testing strategy
Toxicological Sciences, 159, 3-5
- Johansson, H.; Gradin, R.; Forreryd, A.; Agemark, M.; Zeller, K.; Johansson, A.; Larne, O.; van Vliet, E.; Borrebaeck, C.; Lindstedt, M. (2017)
Evaluation of the GARD assay in a blind Cosmetics Europe study
ALTEX, 34, 515-523
- Johansson, H.; Gradin, R.; Johansson, A.; Adriaens, E.; Edwards, A.; Zuckerstätter, V.; Jerre, A.; Burleson, F.; Gehrke, H.; Roggen, E. (2019)
Validation of the GARD™ skin assay for assessment of chemical skin sensitizers – ring trial results of predictive performance and reproducibility
Toxicological Sciences, 170, 374-381
- Johansson, H.; Lindstedt, M.; Albrekt, A.S.; Borrebaeck, C.A. (2011)
A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests
BMC Genomics, 12:399, 1-19
- Jowsey, I.R.; Clapp, C.J.; Safford, B.; Gibbons, B.T.; Basketter, D.A. (2008)
The impact of vehicle on the relative potency of skin sensitising chemicals in the local lymph node assay
Cutaneous and Ocular Toxicology, 27, 67-75
- Kersting, K.; Geier, J.; Hansen, A.; Heine, K.; Steinhausen, M.; Wilke, A. (2021)
Der Arbeitskreis Epoxidharze - eine branchenübergreifende Initiative
Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft, 81, 61-68.
https://www.dguv.de/medien/ifa/de/pub/grl/pdf/gefährstoffe_01-02_2021_x2230-steinhausen.pdf

Kleinstreuer, N.C.; Hoffmann, S.; Alépée, N.; Allen, D.; Ashikaga, T.; Casey, W.; Clouet, E.; Cluzel, M.; Desprez, B.; Gellatly, N.; Göbel, C.; Kern, P.S.; Klaric, M.; Kühnl, J.; Martinozzi-Teissier, S.; Mewes, K.R.; Miyazawa, M.; Strickland, J.; van Vliet, E.; Zang, Q.; Petersohn, D. (2018)
Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches
Critical Reviews in Toxicology, 48, 359-374

Kolle, S.N.; Landsiedel, R.; Natsch, A. (2020)
Replacing the refinement for skin sensitization testing: Considerations to the implementation of adverse outcome pathway (AOP)-based defined approaches (DA) in OECD guidelines
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 115, Article 104713

Labs, S. (2020)
Neues Online-Tool für die Substitutionsprüfung - Mit EIS-Rechner zum Epoxidharz-Ersatz
etem, 6, 14-15

Natsch, A.; Emter, R.; Gfeller, H.; Haupt, T.; Ellis, G. (2015)
Predicting skin sensitizer potency based on *in vitro* data from KeratinoSens and kinetic peptide binding: Global vs. domain-based assessment
Toxicological Sciences, 143, 319-332

Natsch, A.; Haupt, T.; Wareing, B.; Landsiedel, R.; Kolle, S.N. (2020)
Predictivity of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for sensitizer potency assessment and subclassification
ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation, 37, 652-664

Natsch, A.; Landsiedel, R. (2019)
Letter to the editor regarding the article by Roberts, 2018
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 102, 115-116

Nocca, G.; D'Antò, V.; Riviaccio, V.; Schweickl, H.; Amato, M.; Rengo, S.; Lupi, A.; Spagnuolo, G. (2012)
Effects of ethanol and dimethyl sulfoxide on solubility and cytotoxicity of the resin monomer triethylene glycol dimethacrylate
Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials, 100, 1500-1506

O'Boyle, N.; Niklasson, I.B.; Tehrani-Bagha, A.R.; Delaine, T.; Holmberg, K.; Luthman, K.; Karlberg, A.-T. (2014)
Epoxy resin monomers with reduced skin sensitizing potency
Chemical Research in Toxicology, 27, 1002-1010

O'Boyle, N.M.; Delaine, T.; Luthman, K.; Natsch, A.; Karlberg, A.-T. (2012)
Analogues of the epoxy resin monomer diglycidyl ether of bisphenol F: effects on contact allergenic potency and cytotoxicity
Chemical Research in Toxicology, 25, 2469-2478

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (1992)
OECD Guideline for Testing of Chemicals. Skin Sensitisation. No. 406. First adopted: 12th May 1981, used in the most current valid version

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2002)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay. No. 429, First adopted: 24th April 2002, used in the most current valid version

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2010a)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-Elisa. No. 442B, First adopted: 22 July 2010, used in the most current valid version

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2010b)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA. No. 442A, First adopted: 22 July 2010, used in the most current valid version

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2012a)
The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No.168. ENV/JM/MONO(2012)10/PART1
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en)

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2012b)
The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches. Series on Testing and Assessment No. 168. ENV/JM/MONO(2012)10/PART2
<http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282012%2910/part2&doclanguage=en>

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2015a)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). TG 442C. First adopted: 4 February 2015, used in the most current valid version
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_72d77764-en

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2015b)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. TG 442D. First adopted: February 2015, used in the most current valid version
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_72d77764-en

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2016)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation. Human Cell Line Activation Test (h-CLAT). First adopted: 29 July 2016, used in the most current valid version
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_72d77764-en

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2018a)
Draft Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation
https://www.oecd.org/env/ehs/testing/latestdocuments/GL%20DASS_8Oct2018_Clean.pdf

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2018b)
Supporting document for evaluation and review of draft Guideline (GL) for Defined Approaches (DAs) for Skin Sensitisation
https://www.oecd.org/env/ehs/testing/latestdocuments/DAGL%20supporting%20document_8Oct2018_v2_Clean.pdf

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development (2021)
OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Defined Approaches for Skin Sensitisation. No. 497.
First adopted 14 June 2021, used in the most current valid version

Ponting, D.J.; Ortega, M.A.; Niklasson, I.B.; Karlsson, I.; Seifert, T.; Steen, J.; Luthman, K.; Karlberg, A.-T. (2019)

Development of new epoxy resin monomers – A delicate balance between skin allergy and polymerization properties

Chemical Research in Toxicology, 32, 57-66

Reisinger, K.; Hoffmann, S.; Alepee, N.; Ashikaga, T.; Barroso, J.; Elcombe, C.; Gellatly, N.; Galbiati, V.; Gibbs, S.; Groux, H.; Hibatallah, J.; Keller, D.; Kern, P.; Klaric, M.; Kolle, S.; Kuehnl, J.; Lambrechts, N.; Lindstedt, M.; Millet, M.; Martinozzi-Teissier, S.; Natsch, A.; Petersohn, D.; Pike, I.; Sakaguchi, H.; Schepky, A.; Tailhardat, M.; Templier, M.; van Vliet, E.; Maxwell, G. (2015)

Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment

Toxicol In Vitro, 29, 259-270

Roberts, D.W. (2018)

Is a combination of assays really needed for non-animal prediction of skin sensitization potential? Performance of the GARD (Genomic Allergen Rapid Detection) assay in comparison with OECD guideline assays alone and in combination

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 98, 155-160

Roberts, D.W. (2019)

Response to the comments of Natsch and Landsiedel on my paper “Is a combination of assays really needed for non-animal prediction of skin sensitization potential? Performance of the GARD (genomic allergen rapid detection) assay in comparison with OECD guideline assays alone and in combination.”

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 102, 95-97

Roberts, D.W.; Patlewicz, G. (2018)

Non-animal assessment of skin sensitization hazard: Is an integrated testing strategy needed, and if so what should be integrated?

Journal of Applied Toxicology, 38, 41-50

Rossi, L.H.; Ezendam, J. (2018)

Predicting chemically induced skin sensitization by using in chemico / in vitro methods

In: Nicolotti, O., *Computational Toxicology: Methods and Protocols*, Springer New York, 485-504

Schubert, S.; Geier, J.; Skudlik, C.; Reich, A.; Hansen, A.; Buhl, T.; Mempel, M.; Schön, M.P.; John, S.M.; Brans, R. (2020)

Relevance of contact sensitizations in occupational dermatitis patients with special focus on patch testing of workplace materials

Contact Dermatitis, 83, 475-486

SenzaGen (2021)

GARD™skin Dose-Response. In vitro quantitative potency assessment

https://senzagen.com/wp-content/uploads/2021/03/GARDskin_Dose-Response_2021-03-17.pdf

Wareing, B.; Kolle, S.N.; Birk, B.; Alepee, N.; Haupt, T.; Kathawala, R.; Kern, P.S.; Nardelli, L.; Raabe, H.; Rucki, M.; Ryan, C.A.; Verkaart, S.; Westerink, W.M.A.; Landsiedel, R.; Natsch, A. (2020)
The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial

ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation, 37, 639-651

Watzek, N.; Berger, F.; Kolle, S.N.; Kaufmann, T.; Becker, M.; van Ravenzwaay, B. (2017)
Assessment of skin sensitization under REACH: A case report on vehicle choice in the LLNA and its crucial role preventing false positive results

Regul Toxicol Pharmacol, 85, 25-32

Zeller, K.S.; Forreryd, A.; Lindberg, T.; Gradin, R.; Chawade, A.; Lindstedt, M. (2017)

The GARD platform for potency assessment of skin sensitizing chemicals

ALTEX, 34, 539-559

ANHANG

Ergänzend zum vorliegenden Bericht werden der Forschungsförderung die von Eurofins BPT Munich GmbH erstellten Originalstudienberichte gesondert zur Verfügung gestellt. Zur leichten Identifikation des jeweiligen Testmaterials sind diese hier nochmals genannt, die Reihenfolge wird dabei von der Studiennummer bestimmt.

In grauer Schrift, die exemplarischen Härtergemische, die nicht im Fokus des vorliegenden Berichtes zu diesem Forschungsvorhaben, standen.

Stoffname	Studiennummer
TEPA- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (DBC-20-C5) (Ca. 30% polymer amine terminated, ca. 30,8 TEPA, 39,2% BzOH)	STUGC 20AA1280-2
Tetraethylenpentamin (TEPA; DBC-20-A1)	STUGC 20AA1280-3
IPD-Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (DBC-20-B4) (30% polymer amine terminated, ca. 30,8 IPD, 39,2% BzOH)	STUGC 20AA1280-4
Polyamidoamin – Rest TETA < 1% (Epamide 405)	STUGC 20AA1280-5
1,3 BAC- Bisphenol-A-Harz-Addukt in BzOH (DBC-20-D6) (Ca. 30% polymer amine terminated, ca. 30,8 1,3-BAC, 39,2% BzOH)	STUGC 20AA1280-6
Härter Gemisch 1	STUGC 20AA1280-7
Härter Gemisch 2	STUGC 20AA1280-8