

Zytotoxizität

BP 001

Auswahl der Prüfsysteme, Extraktionsverfahren, Referenzmaterialien, Aussagekraft und Auswertung der Ergebnisse

Die Arbeitsgruppe Zytotoxizität und Genotoxizität gibt zu der Norm DIN EN 30993-5 : 1998-08, einer Harmonisierten Norm nach § 6 MPG, folgende ergänzende Hinweise ab:

Prüfsysteme

Ein starres Prüfschema kann nicht vorgegeben werden, die Prüfverfahren sollten je nach Anwendung der Materialien und Produkte festgelegt werden.

Beim **Direkt-Zell-Kontakt-Test** ist darauf zu achten, dass keine konfluenten Kulturen verwendet werden, da dies zu einem Sensitivitätsverlust führt. Weiterhin sollen bei diesem Prüfsystem mechanische Belastungen vermieden werden, da diese eventuell zu falsch positiven Resultaten führen können. Ebenso muss eine Grenzflächenbeurteilung (Zellen/Material) möglich sein, d.h. die Größe des Materials bzw. Produkts richtet sich nach der Größe des verwendeten Zellkulturbehältnisses.

Beim **Agar-Diffusionstest** können falsch negative Ergebnisse erhalten werden, wenn hydrophobe Substanzen aus den Materialien oder Produkten herausgelöst werden, aber die Zellen durch die hydrophobe Agarschicht nicht erreichen. Der Agar-Diffusionstest ist für Materialien zu empfehlen, deren Applikation im Elutionstest schwierig erscheint (z.B. zähflüssige oder gelartige Materialien). Beim Elutionstest ist die Prüfung von sogenannten Superabsorbent schwie- rig. Der Vorschlag der Arbeitsgruppe ist der, den Flüssigkeitsverlust im Prüfbericht mit aufzunehmen. Bei diesem Test sind unbedingt Verdünnungsreihen durchzuführen. Eine einzige Konzentration (höchste Konzentration des Eluats) ist nicht ausreichend.

Hinsichtlich der einzusetzenden **Zelllinien** gelten für Routineuntersuchungen L929 Zellen ausreichend, alle anderen zur Verfügung stehenden Zellkulturen können auch verwendet werden.

Anmerkung: Laut Aussage von Arbeitsgruppenmitgliedern sind Endothelzellen deutlich sensitiver als L929 Zellen und diese wiederum sensitiver als HeLa Zellen.

Mit zunehmendem Alter der Zellkulturen nimmt die Sensitivität des Prüfsystems ab. Die **Passagenzahl** der entsprechenden Kultur sollte im Endbericht angegeben werden.

Jeder **biochemische Parameter** (z.B. BCA, XTT, MTT, Neutralrot) kann eingesetzt werden, wenn dieser für den speziellen Fall aussagekräftig ist.

Extrakterstellung

Die in der Norm genannten Extraktionszeiten können, falls erforderlich, verlängert werden. Sofern nicht steril zur Verfügung gestellt, sollte das Material sterilisiert werden; nur in Ausnahmefällen sollten Extrakte sterilfiltriert werden. Auf jeden Fall ist eine Sterilfiltration von Extrakten im Endbericht anzugeben.

Positivkontrollen

Die Norm fordert das Mitführen negativer, positiver und sonstiger Kontrollwerkstoffe. Als negativer Kontrollwerkstoff kann nach Auffassung der Arbeitsgruppe Standard-Zellkulturmaterial eingesetzt werden. Die Positivkontrollen sollten eine Effektabstufung zeigen, z.B. über eine Verdünnungsreihe oder durch die Verwendung unterschiedlich toxischer Materialien. Da definierte Materialien für Positivkontrollen bisher fehlen, wird empfohlen, Materialien wie Kupfer, Zink, Nickel, Latex, Polystyrol, PVC oder BSI-Standards einzusetzen.

Hinweis: Neue Materialien aus Japan haben sich in einem Ringversuch der TC 194 als geeignet erwiesen.

Aussagekraft der Ergebnisse:

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Ergebnisse eines Zytotoxizitätstests alleine keinesfalls für eine Risikobewertung ausreichen. In die Bewertung sind andere Biokompatibilitätstests einzubeziehen und die Einsatzbedingungen des Produktes zu berücksichtigen. Dies gilt auch für worst-case Untersuchungen. Dabei ist die Auswahl der Tests zu begründen.

Grundsätzlich erlaubt das Vorliegen eines zytotoxischen Effektes keinen Rückschluss auf die Genotoxizität. Auch der Umkehrschluss ist wegen der verschiedenen Mechanismen beider Effekte unzulässig.

Auswertung der Ergebnisse

Bei der Bewertung der Ergebnisse sind mindestens folgende Punkte zu beachten:

In den einzelnen Prüfsystemen müssen Akzeptanzkriterien für ein valides Prüfergebnis festgelegt sein. Diese Akzeptanzkriterien sind entweder in den Prüfplänen oder den Prüfberichten oder in Standardarbeitsmethoden anzugeben.

Die Bewertungskriterien für ein positives bzw. negatives Ergebnis müssen im Prüfplan oder im Endbericht genannt werden.

Eingearbeitete Stellungnahmen/Kommentare/Fundstellen:

Arbeitsgruppe Zytotoxizität und Genotoxizität, Sitzungen am 11.02.1998 und 05.08.1998

Bekanntmachung harmonisierter Normen, Bundesanzeiger Nr. 232 vom 10.12.1995, S. 12062