



**FORSCHUNGSINSTITUT
HOHENSTEIN**
PROF. DR. JÜRGEN MECHEELS

SCHLOSS HOHENSTEIN · D-74357 BÖNNIGHEIM

Strumpfwerk Lindner GmbH
z.H. Herrn Thomas Lindner
Goldbachstraße 40

D-09337 Hohenstein-Ernstthal

Institut für Hygiene und Biotechnologie

Durch das DAP Deutsches Akkreditierungssystem
Profession GmbH akkreditiertes Prüflaboratorium.

Die Akkreditation gilt für die in der Urkunde aufgeführten Prüfverfahren - im Bereich mit "gekennzeichnet".



Ihre Kunden-Nr.	Zuständig für Rückfragen	Durchwahl	Unser Zeichen	Datum
	Dr. Dirk Höfer	271-432	dr.dh / jsi	07. März 2005

UNTERSUCHUNGSBERICHT

Untersuchungs-Nr.: 05.8.0222

Auftraggeber:	Siehe Anschrift
Untersuchungsgut:	Strickschlauch Partie 28685
Untersuchungsziel:	Zytotoxizitätsprüfung in vitro: an L 929 Maus-Fibroblasten: Zellwachstumsuntersuchung durch BCA-Proteinfärbung
Prüfrichtlinie:	Biologische Bewertung von Medizinprodukten ISO 10993-1: 1997: „Evaluation and testing“ ISO 10993-5: 1999: „Test for in vitro cytotoxicity“

Der Untersuchungsbericht umfasst 6 Seiten.

Das Untersuchungsergebnis bezieht sich nur auf die eingereichte Probe. Es darf nicht auszugsweise, sondern nur in seinem vollen Umfang weitergegeben werden. Eine Benützung des Untersuchungsberichts zu Werbezwecken oder die Veröffentlichung freier Interpretationen der Ergebnisse ist nur mit ausdrücklicher Genehmigung der Prüfstelle zulässig. Restliches Untersuchungsgut wird nach Abschluss der Analyse verworfen.

PI-ALL GEMEINWERT-Verfahren/Untersuchungsberichte/HRB Zytotox0222 - deutsch
Q-Kunden - Untersuchungsberichte/Zytotox0222/05.0222 Lindner GmbH.doc

Rev-Sta 2 - Januar 2005

Auftragsforschung · Entwicklungen · Warentests · Materialprüfung und Beratung auf den Gebieten Textchemie · Bekleidungs- und Fertigungstechnik · Textilhygiene · Textreinigung · Bekleidungsphysiologie · Farb- und Weißmetrik · Textilveredlung · Gütesicherung für textile Produkte · Prüfung von Bettfedern

Telefon (07143) 271-0 Telefax (07143) 271-8746 e-mail info@hohenstein.de USt-Id Nr. DE 145002398

Forschungsinstitut Hohenstein Prof. Dr. Jürgen Mecheels GmbH & Co KG,
Registriergericht Vaihingen/Enz HRA 392-Bes., persönlich haftender Gesellschafter:
Beteiligungsgesellschaft Hohenstein GmbH, HRB 155-Bes., Geschäftsführer:
Dr. Stefan Mecheels, Prof. Dr. Jürgen Mecheels

Untersuchungsbericht Nr. 05.8.0222 vom 07. März 2005
Seite 2 von 6 Seiten



Grundsätzliche Vorbemerkung

Gewebeverträglichkeits-Untersuchungen, wie sie im Rahmen dieses Gutachtens untersucht wurden, können Auskunft auf eine generelle biologische Aktivität im Sinne einer Zytotoxizität (zelltoxischen Wirkung) geben.

Die unmittelbare Wirkung von auf der Haut getragenen Prüfmaterialien (wie Textilien) kann in letzter Konsequenz, jedoch nur durch dermatologische Prüfungen ermittelt werden.

Untersuchungsziel

Ziel der Studie:

Mit dieser *in-vitro* Prüfung wird das zytotoxische Potenzial des Prüfmaterials untersucht. Die Prüfung erfolgt mit der Maus Zelllinie L 929 in deren Nährmedium unterschiedliche Konzentrationen des Schweißextraktes der Prüfmaterialien gegeben wurden. Die Vitalität der Zellen bzw. potenzielle zelltoxische Wirkung des Prüfmaterials wird durch die Bestimmung des Proteingehaltes der behandelten Zellkulturen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen quantitativ bestimmt.



Methode

In der angeführten vorliegenden Prüfung wurden am Forschungsinstitut Hohenstein Schweißextrakte des Untersuchungsgutes hergestellt. Dazu wurde das Untersuchungsgut mit einer sauren Schweißlösung (5 g NaCl, 1,95 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g Histidin pro l, pH 5,5) 24 Std. bei 37° C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der hieraus entstandene so genannte Schweißextrakt wurde zunächst im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FKS / pH 7,4) gemischt. Bindegewebszellen L 929 wurden 68 – 72 Std. mit dieser Lösung (Verdünnungsstufen (33,3 % - 4,4 %) behandelt.

Die höchste getestete Konzentration betrug 33,3 % des Schweißextrakts im Endansatz sowie Verdünnungen zu 22,2 %, 14,8 %, 9,9 %, 6,6 % und 4,4 %. Nach der Inkubationsperiode wurde der Proteingehalt der Kulturen mit dem der Kontrollen (Positivkontrolle 5 % DMSO Dimethylsulfoxid in DMEM + 10 % FKS, Negativkontrolle Phosphat-gepufferte Lösung (PBS) 1+1 in DMEM + 10 % FKS) verglichen und daraus das Zellwachstum in Anwesenheit des Prüfmaterials ermittelt. In Gegenwart zelltoxischer Substanzen zeigen sich veränderte Proliferations- und Teilungsraten der Zellen (Wachstumsinhibitions-Test) durch Vergleich des Proteingehaltes der behandelten Zellkulturen mit dem Proteingehalt un behandelter Kontrollkulturen.

Die Zellen

Die Durchführung der Studie erfolgte mit L 929 Zellen (ATCC Nr. CCL1, NCTC Klon 929 L (DSMZ) aus dem Bindegewebe der Maus. Diese Zelllinie wird seit vielen Jahren erfolgreich für *in vitro* Experimente benutzt. Sie zeichnet sich durch eine gute Klonierungsfähigkeit sowie durch eine hohe Proliferationsrate aus.

Zum Versuch wurden Stammkulturen in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner) in DMEM (Biochrom) mit FKS (Biochrom) bei 37°C ± 1°C und 5,0 % CO₂ kultiviert.

Testgruppen

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. Lösungsmittelkontrolle | Phosphat-gepufferte Lösung (PBS) 1+1 in DMEM mit 10 % FKS |
| 2. Positivkontrolle | DMSO (5 %) in DMEM mit 10 % FKS |
| 3. Prüfmaterial | Konzentrationen des Prüfmaterials: 4,4 %, 6,6 %, 9,9 %, 14,8 %, 22,2 % und 33,3 % |

Eine Positivkontrolle wurde in dem Experiment mitgeführt, um die Validität des Testsystems zu bestätigen.

Experimentelle Versuchsdurchführung

Die vorbereitete Prüflösung und die Lösungsmittelkontrolle wurden in 5 Stufen im Verhältnis von 2:3 verdünnt, und 100 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen bzw. 100 µl der Kontrollen im Dreifachansatz in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte (Greiner) pipettiert.

Exponentiell wachsende Stammkulturen wurden in Ca-Mg-freiem PBS gewaschen und ca. 3 Minuten trypsinisiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit DMEM mit 10 % FKS abgestoppt und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zelldichte wurde auf 1,0 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Mit Ausnahme der für die Leerwert-Bestimmung vorgesehenen Ansätze wurden 50 µl der Zellsuspension in jede Vertiefung der 96-Loch-Platte gegeben. Die Zellkulturplatte wurde 69 - 72 Std. im Brutschrank inkubiert (37 ± 1°C, 5,0 % CO₂ / 95 % Luft).

BCA-Färbung und Messung

Der Proteingehalt der Zellkulturen in jedem Ansatz wurde kolorimetrisch bestimmt (BCA-Proteinreagenz, Uptima). Die Messung erfolgte an einem Mikro-Platten Auto-Reader (Tecan GeniosII), ausgerüstet mit einem 540 nm Filter.

Von Absorptionwerten ($A_{540\text{nm}}$) der drei Parallelansätze wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt. Die Berechnung der prozentualen Wachstumshemmung (% WH) erfolgte nach folgender Formel:

$$\% \text{ WH} = 100 - 100 \times \frac{(A_{540\text{nm}} \text{ Probe}) - (A_{540\text{nm}} \text{ Leerwert})}{(A_{540\text{nm}} \text{ Kontrolle}) - (A_{540\text{nm}} \text{ Leerwert})}$$

A _{540nm} Probe:	Absorptionswert des Prüfmaterials
A _{540nm} Leerwert:	Absorptionswert des Leerwertes (ohne Zellen)
A _{540nm} Kontrolle:	Absorptionswert der Lösungsmittelkontrolle

Bewertung der Ergebnisse

Nach Borenfreund und Borrero (*Literatur: Borenfreund, E. und Borrero, O., Cell Biol Toxicol. 1984 Oct;1(1):55-65*) kann der Proteingehalt der Zellkulturansätze als Maß für das Wachstum der L 929 Mausfibroblasten bzw. für eine Wachstumshemmung in Gegenwart zelltoxischer Substanzen dienen. Als eindeutig zelltoxischer Effekt wird hierbei eine Wachstumshemmung von **mehr als 30 %** im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gewertet. Dies wird in der Regel bei der höchsten Extraktionsstufe von 33,3% des Schweißextraktes erreicht.



Schweißextrakte wurden von folgendem Artikel hergestellt:

Probe Nr.	Artikel	
1	Strickschlauch	Partie 28685

Ergebnisse

Probe Nr. 1

Rel. Proteingehalt:

	1	2	3	X	±	s	Wachstums- hemmung in %
Leerwert:	0.1966	0.2023	0.2152	0.2047	±	0.010	
Positivkontrolle:	0.2879	0.2706	0.2798	0.2794	±	0.009	91
Negativkontrolle:	1.0596	1.0065	0.9560	1.0074	±	0.052	0

Lösungsmittelkontrolle:

33,30%	1.0521	0.9839	0.9767	1.004	±	0.042	0
22,20%	1.0243	0.9768	1.0060	1.002	±	0.024	0
14,80%	1.0000	1.0013	0.9984	1.000	±	0.001	0
9,90%	1.0557	0.9642	1.0381	1.019	±	0.049	0
6,60%	0.9925	0.9619	1.0099	0.988	±	0.024	0
4,40%	1.0077	1.0736	1.0522	1.045	±	0.034	0
Mittelwert				1.010			

Prüfmaterial:

33,30%	0.9687	0.9029	0.9228	0.931	±	0.034	9
22,20%	0.9956	0.9900	0.9783	0.988	±	0.009	2
14,80%	1.0391	1.0257	1.0320	1.032	±	0.007	0
9,90%	1.0156	1.0553	1.0387	1.037	±	0.020	0
6,60%	1.0781	1.0407	1.0748	1.065	±	0.021	0
4,40%	1.1365	1.0542	1.0961	1.096	±	0.041	0

Anmerkung

Unter den angegebenen Bedingungen zeigte der Schweißextrakt des Untersuchungsgutes im Zytotoxizitätstest keine signifikante biologische Aktivität. Daraus ist zu schließen, dass im Gebrauch des Untersuchungsgutes keine zelltoxischen Substanzen freigesetzt werden.

Die Biokompatibilitätsuntersuchung nach ISO 10993-5 wird primär angewandt bei Medizinprodukten die in direktem Kontakt zu Körperoberflächen stehen. Die Prüfung auf Zytotoxizität ist als Basis für alle Medizinprodukte anerkannt und erforderlich. Durch den Einsatz von Zellkulturen ist es möglich, aus den geprüften Produkten heraus lösliche toxische Substanzen nachzuweisen. Die Zytotoxizitätsprüfung liefert damit erste Anhaltspunkte für die biologische Verträglichkeit des eingesetzten Produktes. Die Freisetzung toxischer Substanzen aus einem Textilprodukt mit Hautkontakt ist Voraussetzung für die Entstehung einer Hautirritation.

Schloss Hohenstein, 07. März 2005

Der Abteilungsdirektor des Instituts
für Hygiene und Biotechnologie

Dr. med. habil Dirk Höfer



Die Leiterin des Laboratoriums
für Hygiene und Biotechnologie

Dipl.-Biol. Jutta Secker