



FORSCHUNGSINSTITUT HOHENSTEIN

PROF. DR. JÜRGEN MECHEELS

SCHLOSS HOHENSTEIN · D-74357 BÖNNIGHEIM

Büfa Reinigungssysteme GmbH & Co. KG
Frau Pamela Krix
August-Hanken-Straße 30

26125 Oldenburg

Institut für Hygiene und Biotechnologie

Durch das DAP Deutsches Akkreditierungssystem
Prüfwesen GmbH akkreditiertes Prüflaboratorium.

Die Akkreditierung gilt für die in der Urkunde aufgeführten Prüfverfahren - im Bericht mit * gekennzeichnet.



| | | | | |
|-------------------------|--|----------------------|----------------------------|---------------------------|
| Ihre Kunden-Nr. 1716 | Zuständig für Rückfragen Nadja Berner | Durchwahl 271-431 | Unser Zeichen dr. dh/nb | Datum 23. Oktober 2006 |
|-------------------------|--|----------------------|----------------------------|---------------------------|

UNTERSUCHUNGSBERICHT

Untersuchungs-Nr.: 06.8.5-0060

Auftraggeber: Siehe Anschrift

Untersuchungsgut: Ein Textil (50 % Polyester + 50 % Baumwolle) wurde im letzten Spülbad mit Artikel **Lizerna Finish** ausgerüstet.

Untersuchungszeitraum: 16. Oktober – 23. Oktober 2006

Untersuchungsziel: Zytotoxizitätsprüfung in-vitro an L 929 Maus-Fibroblasten:
Zellwachstumsuntersuchung durch BCA-Proteinfärbung

Prüfrichtlinie: Biologische Bewertung von Medizinprodukten
ISO 10993-1: 2003-12 „Evaluation and testing“
ISO 10993-5: 1999-11 „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.

G:\Abteilungen\UHB\Allgemein\Word-Vorlagen\Untersuchungsberichte\UHB\Zytotoxizität FI deutsch
Q:\Kunden - Untersuchungsberichte\Zytotoxizität\2006\06.0060 Fa.Büfa.doc

RevSta 1 – April 2006

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

Telefon (07143) 271-0
Telefax (07143) 271-94199
e-mail info@hohenstein.de

USt-Id Nr.
DE 145002398

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



Grundsätzliche Vorbemerkung

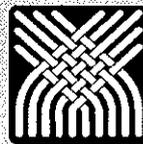
Mit Biokompatibilitätsuntersuchungen nach ISO 10993 wird die Gewebeverträglichkeit von Produkten geprüft, die u.a. auf intakter Haut angewendet werden und in direktem Kontakt zur Körperoberfläche stehen. Die Prüfung auf Zytotoxizität (nach ISO 10993-5) ist als Basis für alle Medizinprodukte anerkannt und erforderlich. Durch den Einsatz von Zellkulturen ist es möglich, aus den geprüften Produkten herauslösbare toxische Substanzen nachzuweisen. Dies wird mit dem Begriff "Zytotoxizität" bezeichnet. 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.

Die Prüfung auf Zytotoxizität erlaubt die Beurteilung eines Gefahrenpotenzials zur Hautirritation. Dieses wird als Summenparameter erfasst. Der Test ist keine Analytik zu den irritationsauslösenden Einzelsubstanzen oder auf allergieauslösende Substanzen.

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 mit Natronlauge auf pH 7,3 – 7,4 eingestellt und sterilfiltriert. Bindegewebszellen L 929 wurden 68 – 72 Std. mit dieser Lösung in Verdünnungsstufen von 33,3 % - 4,4 % behandelt.

Nach der Inkubationsperiode wurde der Proteingehalt der Kulturen mit dem der Kontrollen verglichen und daraus das Zellwachstum in Anwesenheit des Prüfmaterials ermittelt. In Gegenwart zelltoxischer Substanzen zeigen sich veränderte Proliferations- und Teilungsraten der Zellen (Wachstumsinhibitions-Test).

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 (Sarstedt) in DMEM (Cambrex) mit FKS (Sigma) bei 37° C \pm 1° C, 5,0 % CO₂ und 93 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Testgruppen

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

Eine Positiv- und eine Negativkontrolle wurden in dem Experiment mitgeführt, um die Validität des Testsystems zu bestätigen.



Experimentelle Versuchsdurchführung

Exponentiell wachsende Stammkulturen der L 929 Zelllinie wurden in Ca-Mg-freiem PBS gewaschen und ca. 3 Minuten trypsinisiert. Die Zelldichte wurde auf $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Mit Ausnahme der für die Leerwert-Bestimmung vorgesehenen Ansätze wurden 50 µl der Zellsuspension in jede Vertiefung der 96-Loch-Platte (Nunc) gegeben.

Nach einer Vorinkubation wurden 100 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen bzw. 100 µl der Kontrollen im Dreifachansatz in die Vertiefungen pipettiert. Die Zellkulturplatte wurde 69 - 72 Std. im Brutschrank inkubiert ($37 \pm 1^\circ \text{C}$, 5,0 % CO_2 , 93 % Luftfeuchtigkeit).

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.

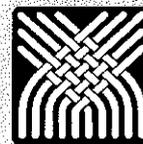
Von Absorptionswerten ($A_{540\text{nm}}$) der drei Parallelansätze wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt. Die Berechnung der prozentualen Wachstumshemmung (% WH) erfolgte nach folgender Formel:

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

| | |
|-------------------------------|--|
| $A_{540\text{nm}}$ Probe: | Absorptionswert des Prüfmateri als |
| $A_{540\text{nm}}$ Leerwert: | Absorptionswert des Leerwertes (ohne Zellen) |
| $A_{540\text{nm}}$ 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 | Im letzten Spülbad |
|-------------|----------------|---|
| 06.8.5-0060 | Lizerna Finish | Textil 50 % Polyester + 50 % Baumwolle |

Bemerkung:

keine

Ergebnisse

Probe Nr. 06.8.5-0060

Rel. Proteingehalt:

| | 1 | 2 | 3 | X | ± | s | Wachstums- hemmung in % |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|---|-------|----------------------------|
| Leerwert: | 0,2186 | 0,1738 | 0,1854 | 0,1926 | ± | 0,023 | |
| Positivkontrolle: | 0,2542 | 0,2694 | 0,2835 | 0,2690 | ± | 0,015 | 95 |
| Negativkontrolle: | 1,6676 | 1,6676 | 1,7535 | 1,6962 | ± | 0,050 | 0 |

Lösungsmittelkontrolle:

| | | | | | | | |
|-------------------|--------|--------|--------|-------|---|-------|---|
| 33,30% | 1,7644 | 1,6445 | 1,6643 | 1,691 | ± | 0,064 | 0 |
| 22,20% | 1,8893 | 1,5308 | 1,7411 | 1,720 | ± | 0,180 | 0 |
| 14,80% | 1,7249 | 1,5698 | 1,6589 | 1,651 | ± | 0,078 | 0 |
| 9,90% | 1,6825 | 1,5576 | 1,7654 | 1,669 | ± | 0,105 | 0 |
| 6,60% | 1,9177 | 1,5372 | 1,5188 | 1,658 | ± | 0,225 | 0 |
| 4,40% | 1,6800 | 1,6435 | 1,7234 | 1,682 | ± | 0,040 | 0 |
| Mittelwert | | | | 1,679 | | | |

Prüfmaterial:

| | | | | | | | |
|---------------|--------|--------|--------|-------|---|-------|----|
| 33,30% | 1,7714 | 1,7395 | 1,8015 | 1,771 | ± | 0,031 | 0 |
| 22,20% | 1,9667 | 1,9762 | 1,8622 | 1,935 | ± | 0,063 | 0 |
| 14,80% | 1,8916 | 1,9126 | 1,8899 | 1,898 | ± | 0,013 | 0 |
| 9,90% | 1,8237 | 1,9769 | 1,8597 | 1,887 | ± | 0,080 | 0 |
| 6,60% | 1,7787 | 1,4897 | 2,0361 | 1,768 | ± | 0,273 | 0 |
| 4,40% | 1,4135 | 1,2106 | 1,4233 | 1,349 | ± | 0,120 | 22 |



Anmerkung

Unter den angegebenen Bedingungen zeigte der Schweißextrakt der Probe 06.8.5-0060 im Zytotoxizitätstest **keine biologische Aktivität**. Daraus ist zu schließen, dass im Gebrauch dieses Untersuchungsgutes **keine zelltoxischen Substanzen** freigesetzt werden, die bei Hautkontakt zu Irritationen führen können.

Die Prüfung auf Zytotoxizität erlaubt die Beurteilung eines Gefahrenpotenzials zur Hautirritation. Dieses wird als Summenparameter erfasst.

Schloss Hohenstein, 23. Oktober 2006

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