

15. Feb. 2012



**Universitätsklinikum
Jena**

Klinik für Hautkrankheiten

Qualitäts-zertifiziert nach DIN EN ISO 9001:2008

Universitätsklinikum Jena · Klinik für Hautkrankheiten · Erfurter Str. 35 · 07743 Jena

smartfiber AG
Breitscheidstr. 154
07407 Rudolstadt

Erfurter Straße 35
07743 Jena

Direktor: Prof. Dr. med. P. Elsner

**Labor für In-vitro-Forschung und
Routinediagnostik**

Laborleiter:
PD Dr. Uta-Christina Hipler
Telefon 03641 93 73 31
Telefax 03641 93 74 37

Ansprechpartner:
Dr. Cornelia Wiegand
Telefon 03641 93 75 84
Telefax 03641 93 74 37

web: [http:// www.derma.uni-jena.de](http://www.derma.uni-jena.de)

10. Februar 2012

Ergebnisbericht:

**Untersuchung der *In vitro*-Zytotoxizität
von Textilprobe
(24h Extrakt, Probennummer: 1201003,
Kissenbezug)**

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 00

Internet: www.uniklinikum-jena.de
Gerichtsstand Jena
Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt.-IdNr. DE 150545777
Bankverbindung:
Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts
als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deufel
Medizinischer Vorstand und Sprecher des Klinikumsvorstandes:
Prof. Dr. Klaus Höffken
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf
Kaufmännischer Vorstand: Dr. Brunhilde Seidel-Kwern


Index

| | Seite |
|---|--------------|
| 1. Qualitätszertifikat | 3 |
| 2. Generelles | |
| 2.1 Proben | 4 |
| 2.2 Referenzmaterial | 4 |
| 2.3 Auftraggeber | 4 |
| 2.4 Prüfeinrichtung | 4 |
| 2.5 Durchführungszeitraum | 4 |
| 3. GLP und Qualitätssicherung | 5 |
| 4. Zusammenfassung | 6 |
| 5. Hintergrund | 7 |
| 6. Material und Methoden | |
| 6.1 Vorbereitung der Proben | 8 |
| 6.2 Anzucht der HaCaT-Keratinocyten | 8 |
| 6.3 Bestimmung der Zellviabilität und Zellproliferation mittels ATP-Biolumineszenz-Messung | 8 |
| 6.4 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Protein Assay | 9 |
| 6.5 Bestimmung der Zytotoxizität mittels photometrischer LDH-Messung | 9 |
| 6.6 Statistik | 10 |
| 7. Dokumentation | 10 |
| 8. Ergebnisse und Diskussion | |
| 8.1 Bestimmung der Zellviabilität und Zellproliferation mittels ATP-Biolumineszenz-Messung | 11 |
| 8.2 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Protein Assay | 12 |
| 8.3 Bestimmung der Zytotoxizität mittels photometrischer LDH-Messung | 13 |
| 9. Appendix | |
| 9.1 Abkürzungsverzeichnis | 14 |
| 9.2 Tabellen und Abbildungen | 15 |
| 9.3 Literatur | 16 |
| 9.4 Messdaten | 17 |



1. Qualitätszertifikat



Zertifikat

QUALITÄTSMANAGEMENTSYSTEM – DIN EN ISO 9001: 2008

Hiermit wird bestätigt, dass das

Universitätsklinikum Jena
Klinik für Dermatologie und
dermatologische Allergologie
Erfurter Straße 35
07740 Jena
Deutschland

Inhaber des Zertifikates Nr. **FS 519135/5409D**

ein Qualitätsmanagementsystem gemäß **DIN EN ISO 9001:2008** für den folgenden Geltungsbereich anwendet:

Dermatologie, Allergologie, Berufsdermatologie, Andrologie, Dermato-
Histologie, Dermato-Onkologie, Hautphysiologie/Skin Study Center,
Forschungslabor, Diagnostisches Labor, Operative Dermatologie, Laser,
Photodermatologie, Proktologie, Phlebologie, Wundheilung

Für und im Namen von BSI:

Geschäftsführung, BSI Management Systems (Deutschland)

Ursprünglich zertifiziert: **12.12.2003** Letzte Ausgabe: **06.10.2009**

Ablaufdatum: **16.10.2012**



GMS/EMS-TGA-ZM 08-92

Seite: 1 von 1

Dieses Zertifikat wurde elektronisch erstellt und bleibt Eigentum der BSI und ist an die Vertragsbedingungen gebunden.
Ein elektronisches Zertifikat kann online beglaubigt werden.
Kopien können auf www.bsigroup.de/de/Audit-und-Zertifizierung/138860/ oder per Telefon +49 (0) 6181 99370 validiert werden.

Die British Standards Institution ist eingetragen in die Royal Charter.
BSI Management Systems und Umweltzertifier Deutschland GmbH, Dännebergstraße 2a, 63452 Hanau, Deutschland.



CONFIDENTIAL – VERTRAULICH

Ergebnisbericht

Untersuchung der *In vitro*-Zytotoxizität von Textilprobe



2. Generelles

2.1 Proben

Textil ecru (Kissenbezug),

Probennummer: 1201003

2.2 Referenzmaterial

-

2.3 Auftraggeber

smartfiber AG

Breitscheidstr. 154

07407 Rudolstadt

2.4 Prüfeinrichtung

Klinik für Hautkrankheiten

Universitätsklinikum Jena

Erfurter Straße 35

D-07740 Jena

Studienleiter: PD Dr. Uta-Christina Hipler

2.5 Durchführungszeitraum

Start: 27.01.2012

Ende: 09.02.2012

Fälligkeit des Berichts: 10.02.2012

CONFIDENTIAL – VERTRAULICH

Ergebnisbericht

Untersuchung der *In vitro*-Zytotoxizität von Textilprobe



3. GLP und Qualitätssicherung

Ich versichere, dass die Prüfeinrichtung entsprechend der "Principles of Good Laboratory Practice" arbeitet und technisch validierte Standard Operating Procedures für die beschriebenen Testmethoden vorliegen. Die Prüfeinrichtung ist nach DIN EN ISO 9001:2008 zertifiziert.

10.2.2012

Datum

Studienleiter: PD Dr. Uta-Christina Hipler



4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung eines Extraktes des Testmaterials (Extraktionsverhältnis: 1g:50mL, Extraktionszeit: 24h, Extraktionstemperatur: 37°C) auf humane HaCaT-Keratinocyten entsprechend der DIN Norm ISO 10993-12 *in vitro* untersucht. Dazu wurden der ATP-Biolumineszenzassay, der BCA-Protein Assay und der Lactatdehydrogenase-Assay eingesetzt.

Die Untersuchungen ergaben, dass für den untersuchten Extrakt (1g:50mL) sowie die eingesetzten Extraktverdünnungen kein zytotoxischer Effekt auf die humanen HaCaT-Keratinocyten nachgewiesen werden konnte. Als Kontrolle diente das Zellkulturmedium.

10.2.2012

Hipler

Datum

Studienleiter: PD Dr. Uta-Christina Hipler



5. Hintergrund

Die Haut stellt die Schnittstelle zwischen unserem Körper und der Umwelt dar. Sie ist funktionell das vielseitigste Organ des menschlichen Organismus und erfüllt unterschiedliche Aufgaben. Sie dient der Abgrenzung nach Außen, dem Erhalt der Homöostase, dem Schutz vor Umwelteinflüssen und ist an Stoffwechselprozessen und immunologischen Vorgängen beteiligt. Unsere Kleidung hat den längsten und engsten Kontakt mit unserer Haut. Im klinischen und kosmetischen Bereich werden daher Textilien bereits in vielfältiger Weise genutzt. Dementsprechend unterliegen sie den Regularien zur Beurteilung und Prüfung im Rahmen eines Risikomanagementsystems [DIN EN ISO 10993-1]. Materialien, die in Kontakt mit menschlichen Zellen oder Gewebe kommen, müssen als bioverträglich deklariert werden. Die Prüfung auf In-vitro-Zytotoxizität wird durch die DIN-Norm EN ISO 10993-5 geregelt. Die Proben können als Extrakte, im direkten Zell/Material-Kontakt oder im indirekten Zell/Material-Kontakt untersucht werden [DIN EN ISO 10993-5, DIN EN ISO 10993-12]. Die Bestimmung der *in vitro* Zytotoxizität ist häufig eine qualitative Analyse, die auf der Untersuchung von Zellschädigung und Zellwachstum nach Kontakt mit dem Material beruht. Dafür werden verschiedene Zelllinien verwendet, wobei diese unterschiedlich sensitiv auf entsprechende Materialien reagieren. Prinzipiell sollten Zellen für die Testung der *in vitro*-Toxizität eingesetzt werden, die den Zellen und Geweben einer späteren Applikation entsprechen [Wiegand & Hipler 2009, Wiegand & Hipler 2008]. Die Biokompatibilität von medizinischen Textilien kann durch weitere zelluläre und molekulare Faktoren bestimmt werden. Mediatoren, wie z.B. Interleukine, vermitteln die Zellproliferation, die Zellmigration und mögliche Entzündungsreaktionen. Durch die Analyse der zellulären Interleukinfreisetzung kann z.B. auf pro-inflammatorische Wirkungen geschlossen werden, die allein durch Zytotoxizitätsprüfungen nicht nachweisbar wären [Hipler & Wiegand 2011, Wiegand et al. 2010, Wiegand & Hipler 2009, Wiegand & Hipler 2008]. Die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein Anzeichen für Zellnekrose, wobei durch die Schädigung der Zellmembran das Enzym aus dem Zytosol der Zellen freigesetzt wird [Wiegand & Hipler 2009, Wiegand & Hipler 2008].



6. Material und Methoden

6.1 Vorbereitung der Proben

In Anlehnung an die DIN-Norm EN ISO 10993-12 wurde 1 g des Testmaterials in 50 mL Medium (Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium, DMEM (Lot 359P072, 12/2012), ohne FKS) für 24 h bei 37°C extrahiert. Das Testmaterial wurde anschließend abgetrennt, indem der Extrakt über Gaze zentrifugiert und dann steril filtriert wurde. Danach erfolgte die Supplementierung mit 10% FKS (fetales Kälberserum, Lot 05372935, 12/2014, Promocell). Zur Untersuchung des Einflusses der Extrakte auf humane Zellen *in vitro* wurden Verdünnungen des Originalextraktes (100%, Extraktionsverhältnis 1g:50mL) in DMEM angefertigt. Die Verdünnungsstufen entsprechen folgenden Extraktionsverhältnissen 75% - 0,75g:50mL, 50% - 0,5g:50mL, 25% - 0,25g:50mL, 10% - 0,1g:50mL und 1% - 0,01g:50mL.

6.2 Anzucht der HaCaT-Keratinocyten

Humane HaCaT-Keratinocyten wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM Lot 359P072, 12/2012, Promocell) kultiviert, welches mit einer 1%igen antibiotisch-antimykotischen Lösung (Lot 07370190, 01/2013, Promocell) und 10%igem fetalem Kälberserum (Lot 05372935, 12/2014, Promocell) supplementiert wurde. Die Kultivierung erfolgte über 7 Tage in 75cm² Zellkulturflaschen (Greiner bio-one) bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Die Zellen wurden anschließend mit Trypsin-EDTA (Lot 1076006, 05/2013, Invitrogen) abgelöst, in 96-Well-Mikrotiterplatten (Greiner bio-one) (30.000 Zellen/cm²) ausgesät und für 48h kultiviert. Die HaCaT-Keratinocyten wurden anschließend mit den angegebenen Verdünnungen des Testmaterials für 1-48h inkubiert. Als Kontrolle dienten in Medium (DMEM) kultivierte Zellen. Als Referenz für eine zytotoxische Wirkung wurde Triton-X100 eingesetzt.

6.3 Bestimmung der Zellviabilität und Zellproliferation mittels ATP-Biolumineszenz-Messung

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte auf der Basis der luminometrischen ATP Messung mit Hilfe des ATPLiteTM-M Assays (Lot 69-11442, 02/2013, PerkinElmer). Der Assay basiert auf der Produktion von Licht, das bei der Reaktion von ATP mit Luciferase und D-Luciferin entsteht. Das emittierte Licht ist zur ATP-Konzentration direkt proportional. 50 µL

CONFIDENTIAL – VERTRAULICH

Ergebnisbericht

Untersuchung der *In vitro*-Zytotoxizität von Textilprobe



der Zelllyselösung wurden jeweils zu 100 μL der Zellsuspension pro Well gegeben. Danach wurde 5 min bei 700 rpm im Orbitalshaker geschüttelt. Nach Addition von jeweils 50 μL Substratlösung (Luciferin/Luciferase) zu jedem Well wurde erneut für 5 min geschüttelt. Danach wurde die Mikrotiterplatte 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend die Lumineszenz im Mikroplattenluminometer LUMIstar Galaxy (BMG LabTechnologies GmbH) gemessen. Die ATP-Konzentrationen wurden auf der Basis einer ATP-Standardkurve ermittelt.

6.4 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Protein Assay

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe des kolorimetrischen BCA Protein Assay Kit (Lot MK166712, Thermo Scientific) bestimmt. Der Assay beruht auf folgendem Prinzip: Protein bildet mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Dazu wurden die HaCaT-Zellen nach entsprechender Inkubationszeit 2x mit PBS gewaschen und dann 10 min mit einer Proteinlyselösung (PBS + 0,1% Triton-X100) bei 90°C lysiert. Im Anschluss wurden die Proteinlysate bei -20°C eingefroren. Die Quantifizierung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mittels einer BSA-Standardkurve, indem zu 25 μL Lysat 200 μL BCA-Reagenz gegeben wurde. Die Bildung des violetten Farbkomplexes erfolgte bei einer 30-minütigen Inkubation bei 60°C . Die Messung der optischen Dichte wurde bei 580nm im Mikrotiterplattenreader FLUOstar Galaxy (BMG LabTechnologies GmbH) durchgeführt.

6.5 Bestimmung der Zytotoxizität mittels photometrischer LDH-Messung

Die Messung der zytotoxischen Wirkung der Probenextrakte erfolgte mittels Cytotoxicity Detection Kit (Lot 12173400, 07/2012, Roche Diagnostics). Dabei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay zur Quantifizierung der Zelllyse, basierend auf der Aktivitätsmessung von Lactatdehydrogenase (LDH), welche bei Zellmembranschädigung aus dem Zytosol in das Medium freigesetzt wird. Durch das freigesetzte LDH wird im ersten Schritt NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ durch Oxidation von Lactat zu Pyruvat umgewandelt. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden 2 H-Atome auf INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolinsalzchlorid) übertragen und dadurch das gelbe Tetrazolinsalz in ein rotes Formazansalz umgewandelt. Eine stärkere Schädigung der Plasmamembran resultiert in

CONFIDENTIAL – VERTRAULICH

Ergebnisbericht

Untersuchung der *In vitro*-Zytotoxizität von Textilprobe



einem Anstieg der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. Dementsprechend ist die Menge des gebildeten Formazansalzes proportional zur Anzahl der lysierten Zellen. 80 µL des Zellkulturüberstandes wurden vorsichtig in eine neue 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und 80 µL der Tetrazolinfarbstofflösung pro Well zugegeben. Danach erfolgte ein Inkubationschritt für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm im MikroplattenPhotometer FLUOstar Galaxy (BMG LabTechnologies GmbH) gemessen. Die Zytotoxizität wurde im Vergleich zu einer Positivkontrolle (Triton-X 100) ermittelt.

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{Mediumkontrolle}}}{\text{OD}_{\text{Positivkontrolle}} - \text{OD}_{\text{Mediumkontrolle}}} \times 100 \%$$

6.6 Statistik

Alle Versuche wurden in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die einzelnen Messungen erfolgen in Vierfachbestimmungen. Angeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgte auf der Basis des Students-T-Test (Microsoft® Excel SP2). Als statistisch signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ bewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden durch Sternsymbolik gekennzeichnet: [***] $p \leq 0,001$; [**] $p \leq 0,01$; [*] $p \leq 0,05$.

7. Dokumentation

Entsprechend der GLP vorschritten werden die folgenden Akten und Daten im Archiv der Klinik für Hautkrankheiten am Universitätsklinikum Jena aufbewahrt:

Eine Kopie des Studienberichtes und das Studienprotokoll sowie die Rohdaten, die während der Studie generiert wurden, werden mindestens für 4 Jahre nach Abschluss der Studie aufbewahrt.

Nicht verwendete Proben und Referenzmaterialien werden mindestens für 12 Monate nach Abschluss der Studie aufbewahrt und danach vernichtet. Materialien und Proben, die über diesen Zeitraum nicht stabil sind, können vor diesem Zeitpunkt ohne die vorherige Zustimmung des Auftraggebers vernichtet werden.

Unterlagen und Berichte zu Wartung und Kalibrierung von Geräten, Validierungen für rechnergestützte Systeme und die Akten der Operating Procedures (SOPs) werden entsprechend der behördlichen Vorschriften aufbewahrt.

CONFIDENTIAL – VERTRAULICH

Ergebnisbericht

Untersuchung der *In vitro*-Zytotoxizität von Textilprobe



8. Ergebnisse und Diskussion

8.1 Bestimmung der Zellviabilität und Zellproliferation mittels ATP-Biolumineszenz-Messung

Zur Untersuchung des Einflusses der Extrakte auf humane Zellen *in vitro* wurden Verdünnungen des Originalextraktes (100%, Extraktionsverhältnis 1g:50mL) in DMEM angefertigt. Die Verdünnungsstufen entsprechen folgenden Extraktionsverhältnissen 75% - 0,75g:50mL, 50% - 0,5g:50mL, 25% - 0,25g:50mL, 10% - 0,1g:50mL, 1% - 0,01g:50mL und 0,1% - 0,001g:50mL.

Die Inkubationszeiten der Verdünnungsstufen auf den Zellen betragen jeweils 1h, 24h bzw. 48h. Als Kontrolle diente das Zellkulturmedium.

Dabei konnte weder für den Originalextrakt noch für die untersuchten Verdünnungsstufen ein zytotoxischer Effekt auf die humanen HaCaT-Keratinocyten nachgewiesen werden (Abb. 1). Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des ATP-Assays durchgeführt.

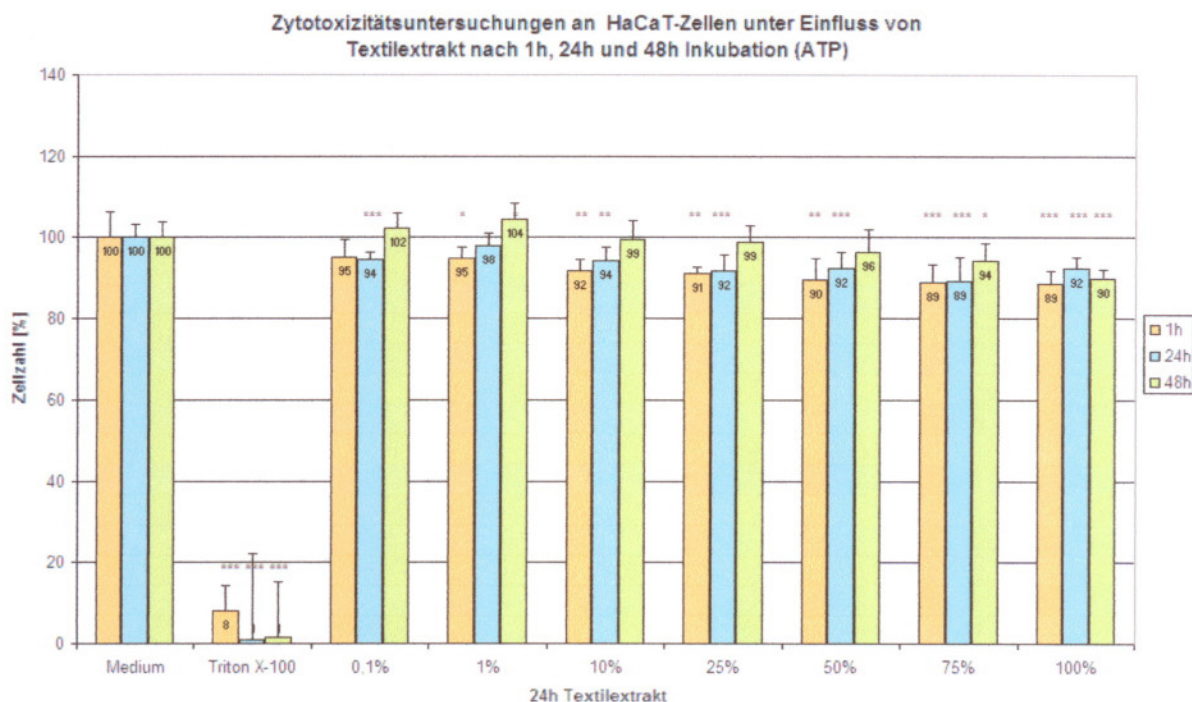


Abbildung 1: Einfluss von 24h Textilextrakt auf HaCaT-Keratinocyten nach 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen erfolgte mittels luminometrischer Messung des zellulären ATP-Gehaltes.



8.2 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Protein Assay

Zur Untersuchung des Einflusses der Extrakte auf humane Zellen *in vitro* wurden Verdünnungen des Originalextraktes (100%, Extraktionsverhältnis 1g:50mL) in DMEM angefertigt. Die Verdünnungsstufen entsprechen folgenden Extraktionsverhältnissen 75% - 0,75g:50mL, 50% - 0,5g:50mL, 25% - 0,25g:50mL, 10% - 0,1g:50mL, 1% - 0,01g:50mL und 0,1% - 0,001g:50mL.

Die Inkubationszeiten der Verdünnungsstufen auf den Zellen betragen jeweils 1h, 24h bzw. 48h. Als Kontrolle diente das Zellkulturmedium.

Dabei konnte weder für den Originalextrakt noch für die untersuchten Verdünnungsstufen ein zytotoxischer Effekt auf die humanen HaCaT-Keratinocyten nachgewiesen werden (Abb. 2).

Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des BCA-Protein Assays durchgeführt.

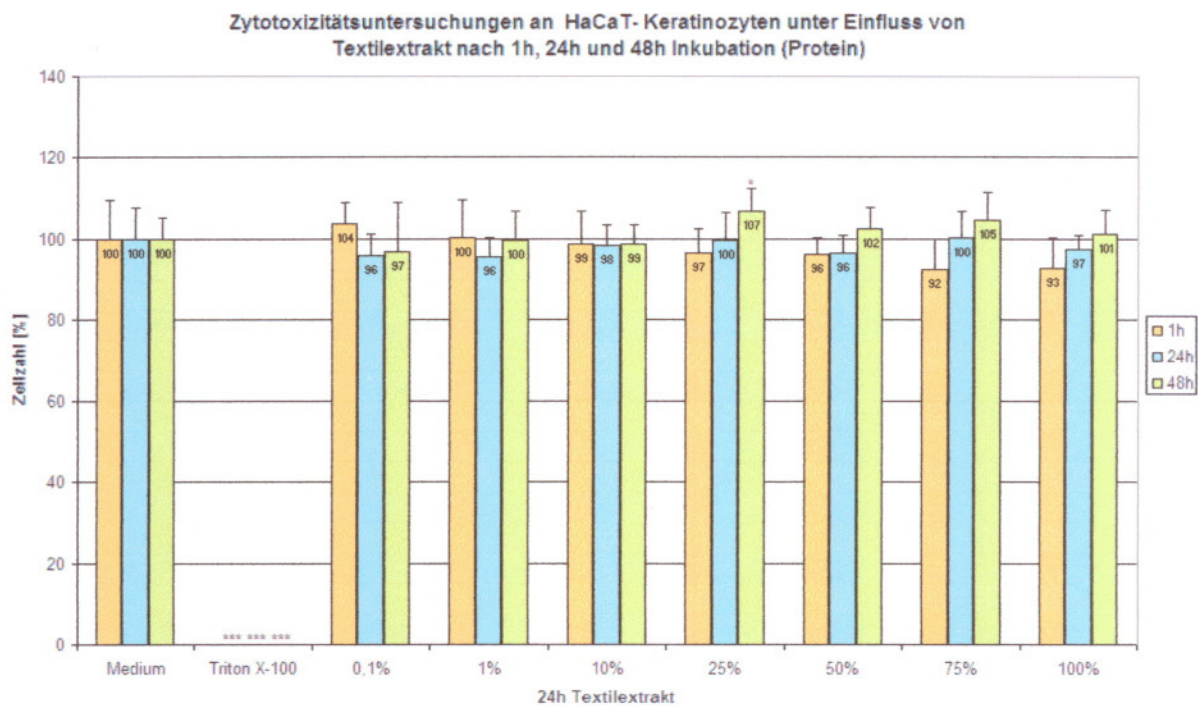


Abbildung 2: Einfluss von 24h Textilextrakt auf HaCaT-Keratinocyten nach 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels kolorimetrischer Messung des Gesamtproteingehaltes.



8.3 Bestimmung der Zytotoxizität mittels photometrischer LDH-Messung

Zur Untersuchung des Einflusses der Extrakte auf humane Zellen *in vitro* wurden Verdünnungen des Originalextraktes (100%, Extraktionsverhältnis 1g:50mL) in DMEM angefertigt. Die Verdünnungsstufen entsprechen folgenden Extraktionsverhältnissen 75% - 0,75g:50mL, 50% - 0,5g:50mL, 25% - 0,25g:50mL, 10% - 0,1g:50mL, 1% - 0,01g:50mL und 0,1% - 0,001g:50mL.

Die Inkubationszeiten der Verdünnungsstufen auf den Zellen betragen jeweils 1h, 24h bzw. 48h. Als Kontrolle diente das Zellkulturmedium.

Dabei konnte weder für den Originalextrakt noch für die untersuchten Verdünnungsstufen ein zytotoxischer Effekt auf die humanen HaCaT-Keratinocyten nachgewiesen werden (Abb. 3). Diese Untersuchungen erfolgten durch Bestimmung der Lactatdehydrogenase im Zellkulturüberstand.

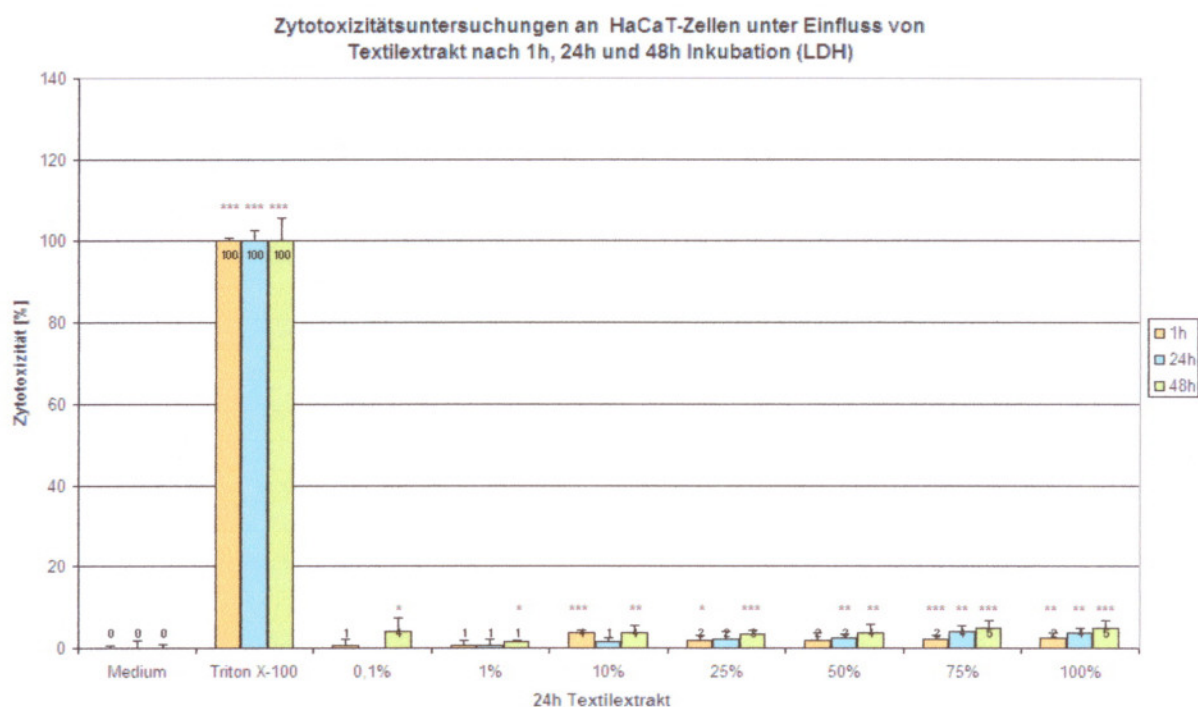


Abbildung 3: Freisetzung von Lactatdehydrogenase durch HaCaT-Keratinocyten nach Behandlung mit Textilextrakt für 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Cytotoxicity Detection Kit im Zellkulturüberstand.



9. Appendix

9.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| cm ² | Quadratcentimeter |
| °C | Grad Celsius |
| BCA | Bicinchonininsäure |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle Medium |
| FKS | fetales Kälberserum |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| IL-6 | interleukin 6 |
| IL-8 | interleukin 8 |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| M | Molar |
| mL | milliliters |
| µL | microliters |
| mM | millimolar |
| MW | Mittelwert |
| PBS | phosphate buffered saline |
| SD | Standardabweichung |



9.2 Tabellen und Abbildungen

| | Seite |
|--|--------------|
| Abbildung 1: Einfluss von 24h Textilextrakt auf HaCaT-Keratinocyten nach 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen erfolgte mittels luminometrischer Messung des zellulären ATP-Gehaltes. | 11 |
| Abbildung 2: Einfluss von 24h Textilextrakt auf HaCaT-Keratinocyten nach 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels kolorimetrischer Messung des Gesamtproteingehaltes. | 12 |
| Abbildung 3: Freisetzung von Lactatdehydrogenase durch HaCaT-Keratinocyten nach Behandlung mit Textilextrakt für 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Cytotoxicity Detection Kit im Zellkulturüberstand. | 13 |
| Tabelle 1: Einfluss von Textilextrakt auf HaCaT-Keratinocyten nach 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen erfolgte mittels luminometrischer Messung des zellulären ATP-Gehaltes. | 17 |
| Tabelle 2: Einfluss von Textilextrakt auf HaCaT-Keratinocyten nach 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels kolorimetrischer Messung des Gesamtproteingehaltes. | 17 |
| Tabelle 3: Freisetzung von Lactatdehydrogenase durch HaCaT-Keratinocyten nach Behandlung mit Textilextrakt für 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase erfolgte mittels kolorimetrischer Messung im Zellkulturüberstand. | 18 |



9.3 Literatur

DIN EN ISO 10993-1 April 2010 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Teil 1: Beurteilung und Prüfung im Rahmen eines Risikomanagementsystems

DIN EN ISO 10993-5 Juni 2007 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Teil 5: Prüfung auf in-vitro-Zytotoxizität

DIN EN ISO 10993-12 Februar 2008 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien

Hipler UC, Wiegand C. in Handbook of medical textiles, ed. V.T. Bartels, Woodhead Publishing, 2011

Wiegand C, Fluhr JW, Elsner P, Hipler UC. in Cellulose: Structure and properties, derivatives and industrial uses, eds. A. Lejeune & T. Deprez, Nova Science Publishers, 2010

Wiegand C, Hipler UC. Skin Pharmacol Physiol 2009; 22:74-82

Wiegand C, Hipler UC. GMS Krankhaushyg Interdiszip 2008 3(1):Doc12



9.4 Messdaten

Tabelle 1: Einfluss von Textilextrakt auf HaCaT-Keratinocyten nach 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen erfolgte mittels luminometrischer Messung des zellulären ATP-Gehaltes.

(n=4, zu Abb. 1)

| Zeit [h] | | Kontrolle | Testmaterial – Extraktkonzentration [%] | | | | | | |
|----------|-----------------|-----------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Medium | 0,1% | 1% | 10% | 25% | 50% | 75% | 100% |
| 1 | ATP-Gehalt [nM] | 15302 | 14580 | 14498 | 14055 | 13939 | 13706 | 13603 | 13564 |
| | SD [nM] | 966 | 626 | 425 | 391 | 220 | 712 | 609 | 421 |
| | Zellzahl [%] | 100 | 95 | 95 | 92 | 91 | 90 | 89 | 89 |
| | SD [%] | 6 | 4 | 3 | 3 | 2 | 5 | 4 | 3 |
| 24 | ATP-Gehalt [nM] | 31640 | 29885 | 31036 | 29779 | 29038 | 29221 | 28240 | 29218 |
| | SD [nM] | 976 | 616 | 906 | 1050 | 1195 | 1167 | 1685 | 820 |
| | Zellzahl [%] | 100 | 94 | 98 | 94 | 92 | 92 | 89 | 92 |
| | SD [%] | 3 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | 6 | 3 |
| 48 | ATP-Gehalt [nM] | 68107 | 69597 | 71140 | 67700 | 67364 | 65699 | 64213 | 61266 |
| | SD [nM] | 2720 | 2755 | 2905 | 3183 | 2730 | 3715 | 2838 | 1353 |
| | Zellzahl [%] | 100 | 102 | 104 | 99 | 99 | 96 | 94 | 90 |
| | SD [%] | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 6 | 4 | 2 |

Tabelle 2: Einfluss von Textilextrakt auf HaCaT-Keratinocyten nach 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels kolorimetrischer Messung des Gesamtproteingehaltes.

(n=4, zu Abb. 2)

| Zeit [h] | | Kontrolle | Testmaterial – Extraktkonzentration [%] | | | | | | |
|----------|------------------------|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | | Medium | 0,1% | 1% | 10% | 25% | 50% | 75% | 100% |
| 1 | Protein-Gehalt [µg/mL] | 38 | 39 | 38 | 37 | 36 | 36 | 35 | 35 |
| | SD [µg/mL] | 4 | 2 | 4 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3 |
| | Zellzahl [%] | 100 | 104 | 100 | 99 | 97 | 96 | 92 | 93 |
| | SD [%] | 10 | 5 | 9 | 8 | 6 | 4 | 7 | 8 |
| 24 | Protein-Gehalt [µg/mL] | 86 | 83 | 83 | 85 | 86 | 83 | 86 | 84 |
| | SD [µg/mL] | 7 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 6 | 3 |
| | Zellzahl [%] | 100 | 96 | 96 | 98 | 100 | 96 | 100 | 97 |
| | SD [%] | 8 | 5 | 5 | 5 | 7 | 4 | 7 | 3 |
| 48 | Protein-Gehalt [µg/mL] | 171 | 166 | 171 | 169 | 183 | 175 | 179 | 173 |
| | SD [µg/mL] | 9 | 20 | 12 | 8 | 11 | 9 | 12 | 10 |
| | Zellzahl [%] | 100 | 97 | 100 | 99 | 107 | 102 | 105 | 101 |
| | SD [%] | 5 | 12 | 7 | 5 | 6 | 5 | 7 | 6 |



Tabelle 3: Freisetzung von Lactatdehydrogenase durch HaCaT-Keratinocyten nach Behandlung mit Textilextrakt für 1, 24 und 48h. Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase erfolgte mittels kolorimetrischer Messung im Zellkulturüberstand.

(n=4, zu Abb. 3)

| Zeit [h] | | Kontrolle | Testmaterial – Extraktkonzentration [%] | | | | | | | |
|----------|-------------------|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| | | Medium | 0,1% | 1% | 10% | 25% | 50% | 75% | 100% | |
| 1 | Zytotoxizität [%] | 0 | 0,7 | 0,5 | 3,6 | 1,9 | 1,9 | 2,2 | 2,5 | |
| | SD [%] | 0,7 | 1,4 | 1,3 | 0,8 | 1,3 | 2,0 | 0,9 | 1,2 | |
| 24 | Zytotoxizität [%] | 0 | 0 | 0,7 | 1,4 | 2,2 | 2,6 | 3,9 | 3,6 | |
| | SD [%] | 2,0 | 0,8 | 1,4 | 1,1 | 1,9 | 0,9 | 1,5 | 1,2 | |
| 48 | Zytotoxizität [%] | 0 | 4,0 | 1,4 | 3,8 | 3,2 | 3,8 | 4,9 | 5,0 | |
| | SD [%] | 0,9 | 3,3 | 0,6 | 1,9 | 1,1 | 2,0 | 2,0 | 1,8 | |