Prüfbericht

Hautirritationstest

Prüfberichtsnummer: ISO 201708-02242A_HI

CYTOX
biologische Sicherheitsprüfungen
Gottlieb-Keim-Straße 60
95448 Bayreuth, Germany

tel. 0921-1511-254
fax 0921-1511-255
mobil 0179-5102577

info@cytox.de
www.cytox.de

Prüfobjekt: 20.09.17

EVA-Kunststoff „LaNe® EVA SKIN"

Durchgeführt im Auftrag von:

W.R. Lang GmbH
Hafenstraße 83
D-56564 Neuwied

Eingang des Prüfmaterials: 16.08.17 Durchführung der Prüfung: 15.09.17

Ergebnis	**Der EVA-Kunststoff „LaNe® EVA SKIN" zeigt keine hautirritierende Wirkung.**

Beschreibung und Durchführung der Prüfung:

Angewandte Norm(en): ISO 10993-10 (2010), ISO 10993-1 (2009), OECD TG 439

Auf der Grundlage von ISO-10993-1 (2009), Kapitel 4.6 wurde eine *in vitro* Prüfung zur Bestimmung der hautirritierenden Wirkung durchgeführt. Verwendet wurde ein *in vitro* rekonstituiertes, humanes, epidermales 3D-Hautkulturmodell, Typ epiCS Lot-Nr. 100-AG1636-1. Die Prüfung wurde auf der Grundlage der ECVAM Arbeitsstandards durchgeführt.
Die Inserts mit den Hautkulturmodellen wurden 24 h vor Verwendung in frischem Maintenance Medium im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

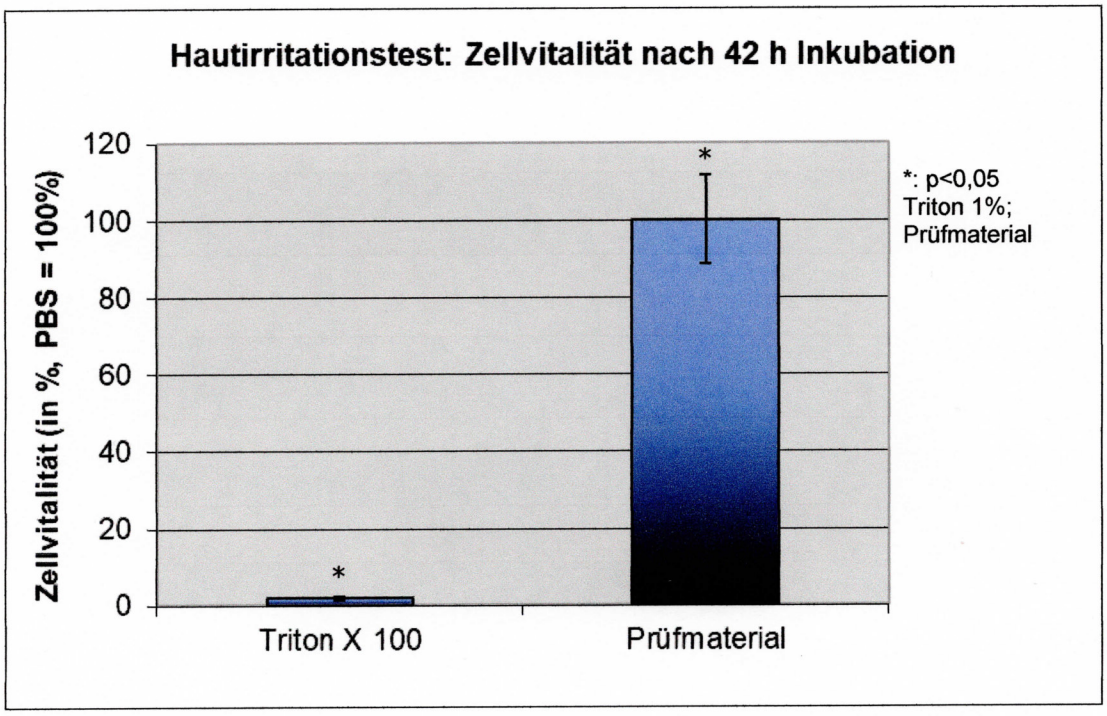
Nach dieser Vorkultivierung wurde auf jedes Insert zur Benetzung 50 µl steriles PBS pipettiert.
Als (hautirritierende) Positivkontrolle wurde nun auf je ein Insert 50 µl Triton X 100 steril aufgebracht, als (nicht hautirritierende) Negativkontrolle auf je ein Insert 50 µl PBS. Auf die dritte Insertgruppe wurden steril entsprechend zugeschnittene Prüfkörper des zu prüfenden Materials (Insertoberflächendurchmesser ca. 8 mm) direkt auf die Insertoberfläche gelegt.
Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Prüfkörpermaterialien aus den Inserts entfernt und alle Inserts intensiv mit sterilem PBS gewaschen, steril trockengetupft und in Zellkulturplatten mit je 1000 µl pro Kavität Maintenance Medium 42 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Messung der LDH-Freisetzung:
Nach Abschluss der 42stündigen Inkubation wurde pro Kavität je 2 x 100 µl Maintenance-Medium entnommen und hiermit die LDH-Freisetzung der Zellen mittels des „Cytotoxicity Detection Kits (LDH)" von Roche Diagnostics bestimmt.

Messung der Zellvitalität mittels MTT:
Die Inserts wurden steril entnommen, auf Papier trockengetupft und in eine 24-Loch-Zellkulturplatte mit je 300 µl Assay Medium verbracht. Das Assay-Medium enthielt zusätzlich 1mg/ml MTT-Substanz (Sigma M5655). Alle Inserts wurden weitere 3 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Inserts erneut trockengetupft und in eine neue, leere 24-Loch-Zellkulturplatte gegeben. Jede Kavität mit Insert wurde mit je 2,0 ml Isopropanol komplett bedeckt, die 24-Loch-Zellkulturplatte mit einer Folie verklebt und 2 h auf einem Plattenschüttler geschüttelt. Jedes Insert wurde nun aufgestochen und der komplette Insertinhalt weitere 10 min auf dem Plattenschüttler geschwenkt. Die Extinktion jedes Isopropanolextraktes wurde bei 570 nm gegen einen Isopropanolblankwert ermittelt. Relativ zum Negativkontrollwert (PBS) wurde nun die Vitalität jedes Hautkulturmodells berechnet.

Ergebnisse:

Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)

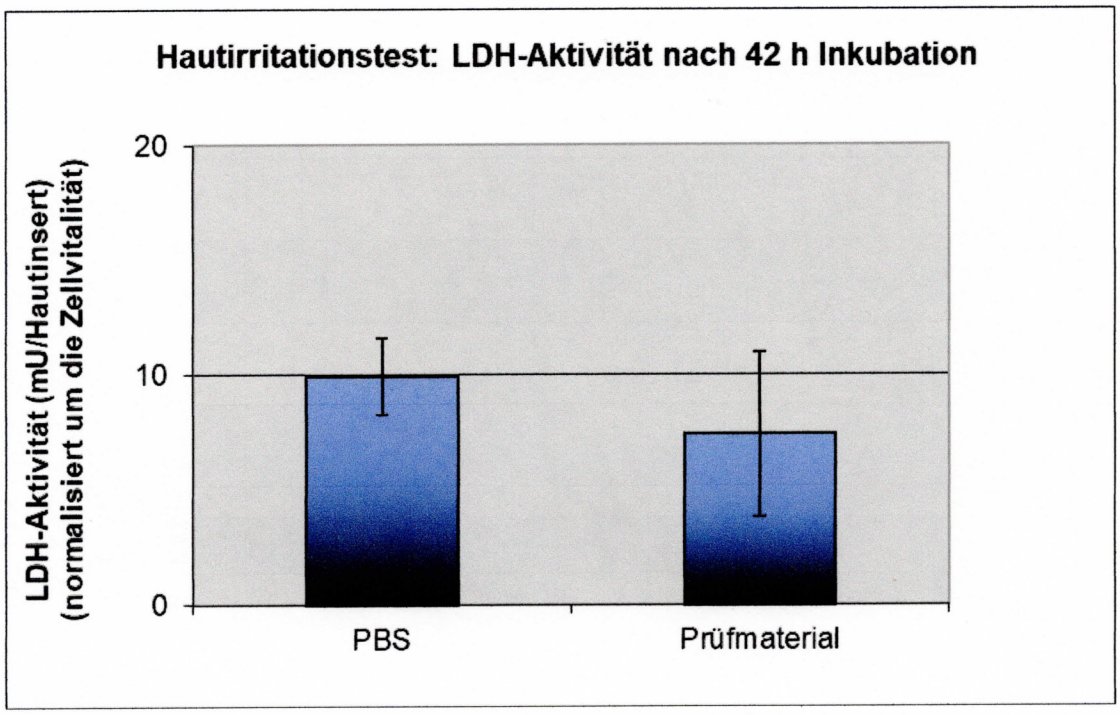


Messwerte (rel. Vitalität)	Versuch (n=2)		
	Triton X 100	PBS	Prüfmaterial
Mittelwert	1,93 %	100 %	100,22 %
Standardabw.	0,42 %	8,31 %	11,43 %

(PBS-Werte nicht in der Grafik dargestellt)

Der Wert der hautirritierenden Positivkontrolle (Triton X 100, 1 %) liegt mit 1,9 % des Negativkontrollwertes im gültigen Bereich unterhalb von 15 % relativ zur PBS-Negativkontrolle.
Vitalitätswerte in Gegenwart von Prüfmaterialien, die den Vitalitätswert der nichthautirritierenden Negativkontrolle um mehr als 50 % unterschreiten, werden als hautirritierend bewertet. Dies ist im vorliegenden Versuch nicht der Fall. Das Prüfmaterial zeigt keine hautirritierende Wirkung.

LDH-Freisetzung



LDH-Freisetzung (mU/ml)	Versuch (n=2)		
	Triton X 100	PBS	Prüfmaterial
Mittelwert	4252,86	9,94	7,42
Standardabw.	42,27	9,07	3,60

(Triton X 100-Werte nicht in der Grafik dargestellt)

Mit dem Prüfmaterial inkubierte Hautinserts zeigen keine signifikante Differenz der LDH-Aktivität im Vergleich zu den mit PBS inkubierten Hautinserts.

Ergebnis	**Der EVA-Kunststoff „LaNe® EVA SKIN" zeigt keine hautirritierende Wirkung.**

Erläuterungen / Interpretationen:

keine

Prüfung durchgeführt von: Dietmar Scheddin

genehmigt durch: Dietmar Scheddin
(Dr. D. Scheddin / Geschäftsführer CYTOX)

Hinweis: Die auszugsweise Wiedergabe des Untersuchungsberichtes ist ohne schriftliche Genehmigung von CYTOX nicht gestattet.