

1 Material und Versuchsdurchführung

1.1 Untersuchungsmaterial

Renew Silicone 20.

Vom Auftraggeber wurden das Prüfmaterial verpackt und zugeschickt. Vor Beginn der Testdurchführung wurde das Prüfmaterial autoklaviert. Als Negativkontrolle wurde ein steriler Silikongummischlauch mit vergleichbarer Masse und als Positivkontrolle 5 % DMSO in DMEM/FKS eingesetzt.

1.2 Herstellen der Extrakte (ISO 10993-12)

Für die Extraktion wurden 0,2 g des Prüfmaterials pro Milliliter Extraktionsmedium eingesetzt. Von der Negativkontrolle (Silikongummi) wurden 0,2 g pro Milliliter Extraktionsmedium eingesetzt.

Extraktionsmedium für polare Extraktion - Dulbecco's Modifikation von Eagle's Minimum Essential Medium mit 10 % Kälberserum (FKS).

Zur Extraktion wurden alle Proben bei 37°C 24 h in einem Orbitalschüttler (Modell G25, Fa. New Brunswick Scientific Co. Inc.) gleichmäßig mit 100 U/min extrahiert.

1.3 Herstellung der Zellkulturen

Zum Zelltoxizitätstest wurden Mausfibroblastenzellen verwendet (ATCC CCL 1, NCTC Clone 929, im folgenden L929 genannt). Als Kultivierungsmedium diente Dulbecco's Modifikation von Eagle's Minimum Essential Medium mit 10 % FKS. Die Zellkultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂-Inkubator. Zur Prüfung der Extrakte wurden 24 h vor Testbeginn Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten vorbereitet. Die von Standardgewebekulturflaschen mittels Trypsin/EDTA geernteten Zellen wurden in DMEM/FKS auf eine Dichte von 1,75 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Pro Kavität wurde 1ml dieser Zellsuspension eingefüllt. Die Platten wurden im CO₂-Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Dabei bildeten sich subkonfluente Monolayer.

1.4 Herstellung abgestufter Verdünnungen der Extrakte aus Probematerial

Abgestufte Verdünnungen der Extrakte aus Probematerial wurden mit DMEM/FKS unter Verwendung des Verdünnungsfaktors 1,5 hergestellt. Daraus ergab sich folgende Abstufung der prozentualen Extraktanteile im Verdünnungsgemisch:

<u>Extraktanteile</u>	a:	100 %
	b:	66 %
	c:	44 %
	d:	30 %
	e:	20 %

Für den Zelltoxizitätstest wurden die Verdünnungsstufen "unverdünnt" (100 %) bis "20 %" eingesetzt. Die Negativkontrolle (Silikongummi) wurde "unverdünnt" (100 %) verwendet. Die Reagenzkontrolle, frisch hergestelltes DMEM/FKS kam unverdünnt zum Einsatz.

1.5 Extraktexposition

Jeder genannten Verdünnungsstufe der Probe- und Kontrolleextrakte wurden drei Kavitäten auf 24-Näpfe-Zellkulturplatten mit subkonfluenten L929-Monolayer zugeordnet. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurde es in den Näpfen durch je 1 ml der vorgesehenen Extraktverdünnungen bzw. Reagenzkontrollen, der Negativkontrolle und der Positivkontrolle ersetzt. Danach wurden die Zellkulturplatten für 24 Stunden im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ in Luft bebrütet.

1.6 Qualitative Bestimmung der Zelltoxizität der Extrakte aus Probe- und Kontrollmaterial

Nach 24-stündiger Exposition wurden die Zellkulturplatten im Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung mikroskopiert. Der Grad der Toxizität wurde nach mikroskopischer Beurteilung einer Werteskala von 0 bis 4 zugeordnet:

- 0: Zellschicht intakt, keine Zellschädigung beobachtbar
- 1: Zellschädigung beobachtbar, aber nicht mehr als 25 % aller Zellen betroffen
- 2: mehr als 25 %, aber nicht mehr als 50 % der Zellen sind geschädigt oder abgestorben

- 3: Zellschädigung oder Zelltod betreffen mehr als 50 %, aber nicht mehr als 75 % aller Zellen
- 4: mehr als 75 % aller Zellen in der Kavität sind abgestorben, der Monolayer kann völlig zerstört sein

Danach wurde das Zellkulturmedium aus den Näpfen der Zellkulturplatten abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurden die Zellen in den Näpfen mit Methanol fixiert (zweimal mit 5 Minuten Dauer). Es folgte die Anfärbung mit 0,25 %iger wässriger Kristallviolettlösung für 10 Minuten. Überschüssiger Farbstoff wurde durch viermaliges Spülen mit Leitungswasser und einmaliges Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Danach wurden die Platten entwässert und bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Diese Präparate wurden sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch beurteilt. Der zellgebundene Farbstoff wurde mit 33 %iger Essigsäure extrahiert und in Aliquots auf Mikrotiterplatten überführt. Die Platten wurden bei 550 nm im Micro Plate Reader gelesen. Die ermittelten Extinktionswerte liefern ein relatives Maß für die Zelldichte in den Näpfen der 24-Näpfe-Platten.

1.7 **Quantitative Bestimmung der Zelltoxizität der Extrakte aus Probe- und Kontrollmaterial**

Für je drei Replikate der Probeextraktverdünnungen und Kontrollansätze wurden die mittleren Extinktionswerte bestimmt. Der Extinktionsmittelwert der Negativkontrolle (Silikongummiextrakt) wurde mit 100 % Wachstum angesetzt. Alle anderen gemessenen Extinktionsmittelwerte wurden im Rahmen einer angenommenen Zufallsvariabilität von maximal 5 % auf diesen Mittelwert bezogen.

Die prozentuale Hemmung des Zellwachstums (% HZW) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ HZW} = 100 - 100 \times \frac{E_{550} \text{ Probe}}{E_{550} \text{ Negativkontrolle}}$$

2 Testergebnisse

2.1. Ergebnisse der makroskopischen und mikroskopischen Beurteilung

Unter frischem Kulturmedium blieben die Zellschichten ungeschädigt (Grad 0). Ebenfalls unbeschadet wurde die Überschichtung mit dem unverdünnten Extrakt der Negativkontrolle (Silikongummi) vertragen (Grad 0).

Die Positivkontrolle (5 % DMSO in DMEM / FKS) führte zur erwarteten ca. 50 %igen Zellschädigung (Grad 3).

Die 24-stündige Inkubation der Zellkulturen mit Verdünnungen des **polaren Extraktes** brachte folgendes Ergebnis:

Grad der Toxizität

Konzentrationen	Napf-Nr.		
	1	2	3
100 %	0	0	0
66 %	0	0	0
44 %	0	0	0
30 %	0	0	0
20 %	0	0	0

Mikroskopisch waren keine morphologischen Veränderungen/zytoplasmatische Schäden der Testzellen erkennbar.

2.2 Ergebnisse des Farbstoff-Elutionstests

Polare Extraktion:

	Relative Zellmenge pro Kavität gemessen an Farbstoffbindung (Extinktionswerte 550 nm)			Mittelwerte ± Standard- abweichung			HZW %
	1	2	3				
Positivkontrolle (DMSO 5 % v/v)	0,52	0,52	0,53	0,53	±	0,01	54,18
Negativkontrolle (Silikongummi Extrakt unverdünnt)	1,12	1,15	1,18	1,15	±	0,02	0,00
Testextrakt							
100 % v/v	1,01	1,04	1,03	1,03	±	0,01	10,45
66 % v/v	1,12	1,12	1,10	1,12	±	0,01	2,63
44 % v/v	1,20	1,20	1,18	1,19	±	0,01	0,00
30 % v/v	1,26	1,26	1,24	1,25	±	0,01	0,00
20 % v/v	1,12	1,15	1,13	1,14	±	0,01	0,71
Reagenzkontrolle (DMEM/FKS, frisch)	1,16	1,16	1,15	1,16	±	0,00	0,00

3 Bewertung der Testergebnisse

Unter den nach DIN ISO 10993-5 gewählten Testbedingungen zeigte der Extrakt der Probe:

„Renew Silicone 20“

keine Schädigungen auf subkonfluente Monolayer von L929-Zellen. Die spektrophotometrischen Ergebnisse entsprachen der mikroskopischen Beurteilung. Die im Test mitgeführten Kontrollen bestätigten die Funktion der Prüfung (Testgültigkeit).