OSTTHÜRINGISCHE
MATERIALPRÜFGESELLSCHAFT
für Textil und Kunststoffe mbH
Breitscheidstraße 97
07407 Rudolstadt

Deutsche Akkreditierungsstelle D-PL-11118-01-00

Nach DIN EN ISO/IEC 17025 durch die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH akkreditiertes Prüflaboratorium.
Die Akkreditierung gilt für die in der Urkunde aufgeführten Prüfverfahren.

GBneuhaus GmbH
Am Herrnberg 10
98724 Neuhaus am Rennweg

Ihre Nachricht vom	Ihre Zeichen	Unsere Zeichen	Tel. Durchwahl Bearbeiter	Datum
25.07.2017		4.5/B49/2017	03672 379-521	18.08.2017

PRÜFBERICHT

1 *Allgemeines*

Prüfbericht- Nr.:	4.5/B49/2017	
Auftraggeber:	GBneuhaus GmbH, Herr Bauer	
Prüfgegenstand:		**interne Labornummer**
Probe 1	Borofloat Referenz (unbeschichtet)	3188
Probe 2	Borofloat mit H2073	3189
Probe 3	Borofloat mit H2081	3190
Probenahme:	durch Auftraggeber	
Prüfziel:	Bestimmung der *in-vitro*-Zytotoxizität nach DIN EN ISO 10993-5:2009	
Eingangsdatum:	07.08.2017	
Bearbeitungszeitraum:	14. – 16.08.2017	
Bearbeiter:	Frau Mantke, Frau Dr. Bauer	
Unterauftragnehmer:	keine	
Prüfverfahren:	1) DIN EN ISO 10993-5:2009; Deutsche Fassung (Extraktverfahren)/ SOP_4.5.503Bio	
Bemerkung:	keine	
Seitenanzahl:	7	
Berichtsausfertigung:	1 Exemplar für Auftraggeber 1 Exemplar für OMPG mbH	

Die Prüfungen wurden zwischen dem Eingangsdatum und dem Berichtsdatum durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen und Analysen beziehen sich ausschließlich auf die Prüfgegenstände. Dieser Prüfbericht ist nur mit Unterschrift des Laborleiters oder seines Vertreters rechtsgültig. Er darf nur komplett vervielfältigt werden. Auszugsweise Vervielfältigungen bedürfen der schriftlichen Genehmigung des Labors.

2 *Prüfgegenstand*

Proben Nr.	Bezeichnung des Prüfgegenstandes	Beschreibung des Prüfgegenstandes (Material, Beschaffenheit, Farbe, ggf. Einsatzzweck)
3188	Borofloat Referenz (unbeschichtet)	Glasplatte
3189	Borofloat mit H2073	Glasplatte
3190	Borofloat mit H2081	Glasplatte

3 *Prüfverfahrensbeschreibung*

In der DIN EN ISO 10993 Teil 5 wird mit dem Extraktionsprüfverfahren ein Verfahren zur Beurteilung der *in-vitro*-Zytotoxizität von herauslösbaren toxischen Substanzen aus Produkten beschrieben. Die Bestimmung der zellschädigenden Effekte (*in-vitro*-Zytotoxizität) beruht auf der Untersuchung des Zellwachstums und der Zellschädigung nach Kontakt mit dem Prüfmaterial. Die Extraktherstellung erfolgt nach der DIN EN ISO 10993-12. Die Prüfmaterialextrakte werden entsprechend den Vorgaben der DIN EN ISO 10993-5 mit einer Zelllinie über einen definierten Zeitraum in Kontakt gebracht. Anschließend erfolgt die Bestimmung des Zellwachstums mittels eines geeigneten Proliferationsassays. Die Beurteilung der Proben basiert auf der Berechnung des Wachstums der Zellen mit Probenextrakt im Vergleich zur Kontrolle.
Das Extraktverfahren mit Zellkulturmedium wurde für die Proben gewählt, da hierbei sowohl polare als auch unpolare Substanzen aus dem Material herausgelöst und somit alle löslichen Bestandteile erfasst werden, die eine toxische Wirkung hervorrufen könnten.

Die Untersuchung auf *in-vitro*-zytotoxische Eigenschaften von Probenextrakten wurde anhand der murinen Fibroblasten-Zelllinie L-929 wie folgt durchgeführt:

1. Herstellung der Probenextrakte:
   - Überführen des Probenmaterials in **Petrischalen**
   - **Dampfsterilisieren der Proben für 15 min bei 121°C**
   - Versetzen der Proben mit je 1 ml Zellkulturmedium **je 3cm^2 (19 ml je Probe = 56 cm^2)**
   - **Verschluss der Petrischalen mit Parafilm**
   - Extraktion für 24 h bei 37 °C und **70** U/min

2. Vorinkubation der Zellen
   - permanente Kultivierung der Fibroblasten-Zelllinie L-929 in 75 cm^2-Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO_2
   - Ablösen der Zellen zur Passage (nach 48 h) mit Trypsin
   - Einstellen der Zelldichte mit Zellkulturmedium auf $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml
   - Überführen von je 100 µl der Zellsuspension in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte
   - Inkubation der Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2

3. Inkubation mit Probenextrakten
   - Verdünnung der Extrakte mit Zellkulturmedium in einer 1 : 2-Verdünnungsreihe
   - Abnahme des Zellkulturmediums von den Zellen
   - Zugabe von 100 µl der entsprechenden Extraktverdünnungen in Dreifachbestimmung zu den Zellen
   - Inkubation der Zellen für 24 h 37 °C und 5 % CO_2

4. Morphologische Beurteilung
   - mikroskopische Untersuchung zur Beurteilung von Zellveränderungen hinsichtlich der Vakuolisierung, der Ablösung, der Zellauflösung und der Zellmembranintegrität

5. Messung der Zellvitalität
   - Zugabe von 50 µl XTT-Reagenz (AppliChem GmbH)
   - Inkubation für 4 h bei 37 °C und 5 % CO2
   - Messung der optischen Dichte bei 630 nm und 450 nm

Berechnung des Zellwachstums:

$$\boldsymbol{Wachstum}\,[\%] = \frac{OD_{450\,nm\,Probe} - OD_{630\,nm\,Probe}}{OD_{450\,nm\,Kontrolle} - OD_{630\,nm\,Kontrolle}} \cdot \mathbf{100}\%$$

Wachstum	=	Anteil lebender Zellen in % im Vergleich zur Kontrolle
$OD_{450\,nm\,Probe}$	=	Wert der optischen Dichte der Probe bei 450nm
$OD_{630\,nm\,Probe}$	=	Wert der optischen Dichte der Probe bei 630nm
$OD_{450\,nm\,Kontrolle}$	=	Wert der optischen Dichte der Kontrolle bei 450nm
$OD_{630\,nm\,Kontrolle}$	=	Wert der optischen Dichte der Kontrolle bei 630nm

Beurteilungskriterien:

Zellvitalität (XTT-Assay)

Wachstum	Bewertung
100% - 70%	nicht zytotoxisch
< 70%	zytotoxisch

OSTTHÜRINGISCHE
MATERIALPRÜFGESELLSCHAFT
für Textil und Kunststoffe mbH
Breitscheidstraße 97
07407 Rudolstadt

Morphologische Bewertung:

Gradeinteilung	Reaktivität	Zustand der Zellkultur
0	Keine	Diskrete intrazytoplasmatische Granuli, keine Zellauflösung, keine Verringerung des Zellwachstums
1	Gering	Nicht mehr als 20% der Zellen sind rund, lose anhaftend und ohne intrazytoplasmatische Granuli oder zeigen Änderungen in der Morphologie, vereinzelt sind aufgelöste Zellen vorhanden, nur geringe Wachstumshemmung bemerkbar
2	Leicht	Nicht mehr als 50% der Zellen sind rund, frei von intrazytoplasmatischen Granuli, keine ausgedehnte Zellauflösung, nicht mehr als 50% Wachstumshemmung bemerkbar
3	Mäßig	Nicht mehr als 70% der Zellschichten enthalten runde Zellen oder sind aufgelöst. Zellschichten sind nicht vollständig zerstört, jedoch ist mehr als 50% Wachstumshemmung bemerkbar
4	Stark	Fast vollständige oder vollständige Zerstörung der Zellschichten

Material und Testbedingungen:

Proben:	BL	Blindprobe: Zellen mit Kulturmedium
	PK	Positivkontrolle: 2 mg/ml SDS
	NK	Negativkontrolle: PP Bormed Folie
	3188	Borofloat Referenz (unbeschichtet)
	3189	Borofloat mit H2073
	3190	Borofloat mit H2081
Probenvorbereitung:	Überführen von **56 cm²** der Proben in **Petrischalen**	
Extraktbedingungen:	24 h bei 37 °C und **70** U/min in DMEM F12 + 5 % FKS + Antibiotika (Chargennummern intern dokumentiert)	
Testzellen:	**murine Fibroblasten-Zelllinie L-929** (ATCC Nr. CCL1, NCTC Klon 929L; CLS Cell Line Service GmbH; die Zelllinie ist in der DIN EN ISO 10993-5 als geeignete Zelllinie aufgeführt und wird seit vielen Jahren für *in-vitro*-Testungen verwendet)	
Zellkulturmedium:	**DMEM F12 + 5 % FKS (fötales Kälberserum)** (DMEM F12, FKS: Fa. Biowest, Chargennummern intern dokumentiert)	
Inkubationszeit der Zellen mit den Extrakten:	24 h bei 37 °C und 5 % CO_2	
Probenvolumen/Well:	100 µl	
Nachweisreagenz:	XTT (AppliChem GmbH)	

4 *Ergebnisse*

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 sowie in Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 1: Wachstum der murinen Fibroblasten-Zelllinie L-929 nach 24-stündiger Inkubation mit den Probenextrakten. Die Berechnung erfolgte in % zur Blindprobe.

Extrakt-Konz	Zellvitalität		STABW		Bewertung	Morphologie-Beurteilung	
Probe: BL							
100 %	100,0	±	5,8	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
Probe: NK							
100 %	96,6	±	11,3	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
50 %	102,6	±	2,1	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
25 %	100,9	±	5,0	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
12,5 %	100,2	±	3,8	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
Probe: PK							
100 %	6,7	±	0,2	%	zytotoxisch	4	starke Reaktivität
50 %	7,0	±	0,1	%	zytotoxisch	4	starke Reaktivität
25 %	7,1	±	0,1	%	zytotoxisch	4	starke Reaktivität
12,5 %	7,4	±	0,1	%	zytotoxisch	4	starke Reaktivität
Probe: P1	**3188**	**Borofloat Referenz (unbeschichtet)**					
100 %	97,0	±	1,8	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
50 %	104,6	±	2,2	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
25 %	100,4	±	1,8	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
12,5 %	102,4	±	1,4	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
Probe: P2	**3189**	**Borofloat mit H2073**					
100 %	88,9	±	5,6	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
50 %	97,7	±	4,7	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
25 %	99,4	±	4,3	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
12,5 %	86,9	±	5,2	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
Probe: P3	**3190**	**Borofloat mit H2081**					
100 %	93,1	±	0,5	%	nicht zytotoxisch	1	geringe Reaktivität
50 %	94,6	±	5,3	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
25 %	94,3	±	7,6	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität
12,5 %	93,6	±	5,1	%	nicht zytotoxisch	0	keine Reaktivität

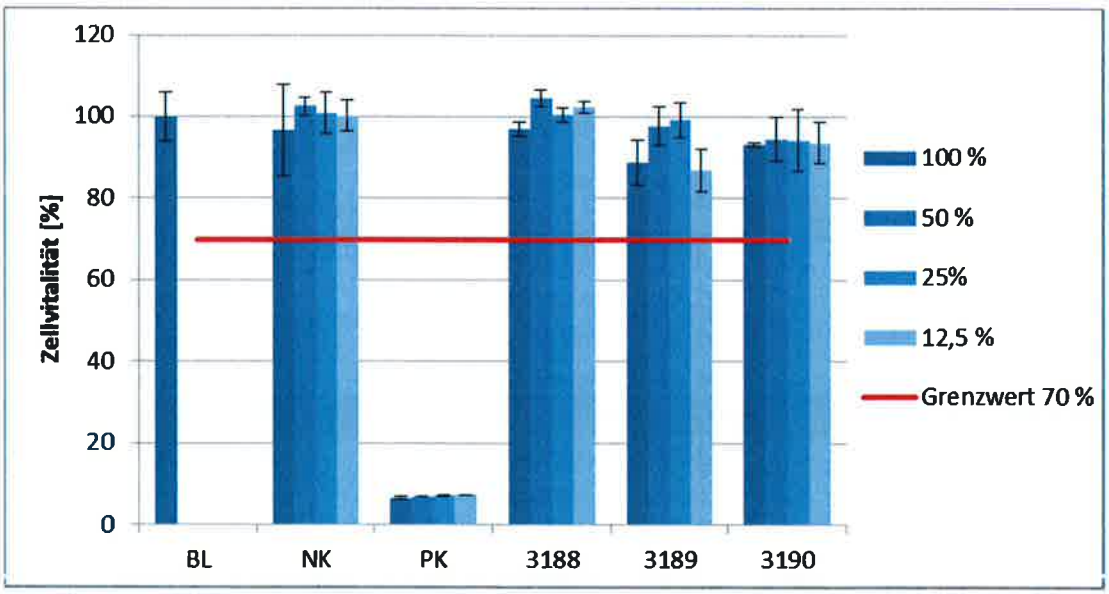

Abbildung 1: Einfluss der Probenextrakte auf das Wachstum der murinen Fibroblasten-Zelllinie L-929. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Proliferationsassays bestimmt. Die Darstellung des Zellwachstums erfolgt in Prozent zur Blindprobe. BL: Blindprobe; NK: Negativkontrolle; PK: Positivkontrolle.

5 Beurteilung

XTT-Proliferationsassay

Die Proben Borofloat Referenz (unbeschichtet) [3188], Borofloat mit H2073 [3189] und Borofloat mit H2081 [3190] sind nicht zytotoxisch gegenüber der Mausfibroblasten-Zelllinie L-929.

Morphologische Beurteilung

Die mikroskopische Untersuchung der Zellen bestätigte diese Ergebnisse. Während eine Inkubation der Fibroblasten mit dem unverdünnten Extrakt der Proben Borofloat Referenz (unbeschichtet) [3188], Borofloat mit H2073 [3189] und Borofloat mit H2081 [3190] waren keine morphologisch sichtbaren Zellschädigungen oder Wachstumsverringerungen nachweisbar.

Eine abschließende Beurteilung der unverdünnten Probenextrakte ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Bewertung der *in vitro*-Zytotoxizität der 100 % igen Probenextrakte an der murinen Fibroblasten-Zelllinie L-929.

Probe		**Bezeichnung**	**Bewertung**
BL		Blindprobe: Zellen mit Kulturmedium	nicht zytotoxisch
PK		Positivkontrolle: 2 mg/ml SDS	zytotoxisch
NK		Negativkontrolle: PP Bormed	nicht zytotoxisch
P1	3188	Borofloat Referenz (unbeschichtet)	nicht zytotoxisch
P2	3189	Borofloat mit H2073	nicht zytotoxisch
P3	3190	Borofloat mit H2081	nicht zytotoxisch

Dr. J. Bauer
Laborleiterin Biologie
Abteilung Kunststoff-Forschung