

TC

TOXI-COOP ZRT.

TOXI-COOP ZRT.

Adresse: 8230 Balatonfüred, Arácsi út 97-99.
Ungarn

Telefon: +36-30-678-2994

Abschlussbericht

***In Vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung mit Wunderrein im EPISKIN-Modell**

Untersuchungsnummer: **960-431-5173**

Datum des Abschlussberichts: **30. März 2020**

(Bericht einschl. Anhängen insgesamt 33 Seiten)

Sponsor:

**PUROLEX Betriebshygiene &
Gastroservice GmbH**
Mario Hofer
Natschlag 47
4160 Aigen Schlägl
Österreich

Verfasser:

István Buda
Toxi-Coop ZRT.
Arácsi út 97-99.
8230 Balatonfüred
Ungarn

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|--|--------------|
| Erklärung des Untersuchungsleiters | 5 |
| Erklärung des Managements | 6 |
| Qualitätssicherungserklärung | 7 |
| Allgemeine Erklärungen und Verantwortlichkeiten | 8 |
| Untersuchungsablauf | 9 |
| 1.0 Zusammenfassung | 10 |
| 2.0 Untersuchungszweck und Einführung | 11 |
| 3.0 Behördliche Vorgaben und Testmethoden | 11 |
| 4.0 Archivierung | 12 |
| 5.0 Materialien und Methoden | 12 |
| 5.1 Prüfgegenstand | 12 |
| 5.1.1 Name und Daten des Prüfgegenstands | 12 |
| 5.1.2 Identifizierung, Erhalt | 13 |
| 5.1.3 Rezeptur | 13 |
| 5.2 Kontrollen | 14 |
| 5.2.1 Negative Kontrolle | 14 |
| 5.2.2 Positive Kontrolle | 14 |
| 5.3 Weitere Materialien | 14 |
| 5.3.1 MTT-Stammlösung..... | 14 |
| 5.3.2 MTT-Fertiglösung..... | 15 |
| 5.3.3 Angesäuertes Isopropanol..... | 15 |
| 5.3.4 Im Experiment verwendete Chemikalien..... | 15 |
| 5.4 Testsystem | 15 |
| 5.4.1 Menschliche Haut | 15 |
| 5.4.2 Rechtfertigung des gewählten Testsystems | 16 |
| 5.4.3 Leistungsnachweis | 16 |
| 5.4.4 Qualitätskontrolle..... | 16 |
| 5.4.5 EpiSkin TM SM KIT-Inhalte..... | 16 |
| 5.4.6 Anzahl der Wiederholungen | 16 |
| 5.4.7 EpiSkin TM SM KIT-Erhaltsverfahren | 17 |
| 5.4.8 EpiSkin TM SM KIT-Lagerung..... | 17 |
| 5.5 Indikator für mögliche falsche Funktionsfähigkeit | 17 |
| 5.5.1 Prüfmethode für mögliche direkte MTT-Reduzierung beim Prüfgegenstand | 17 |
| 5.5.2 Prüfmethode zur Ermittlung des Farbpotentials des Prüfgegenstands | 18 |
| 6.0 Beschreibung des Testverfahrens | 19 |
| 6.1 Vorinkubation | 19 |
| 6.2 Anwendung | 19 |
| 6.3 Einwirkung | 19 |
| 6.4 Spülen | 19 |

| | | |
|------|---|-----------|
| 6.5 | MTT-Test..... | 20 |
| 6.6 | Formazan-Extraktion | 20 |
| 6.7 | Messungen der Zellenfunktionsfähigkeit..... | 20 |
| 7.0 | Auswertung der Versuchsdaten..... | 21 |
| 7.1 | Berechnungen der Funktionsfähigkeitsprozentsätze..... | 21 |
| 7.2 | Datenberechnung für MTT-interagierende Elemente..... | 22 |
| 7.3 | Test-Akzeptanzkriterien..... | 23 |
| 7.4 | Interpretation der Testergebnisse | 23 |
| 8.0 | Abweichungen des Untersuchungsablaufs..... | 24 |
| 9.0 | Anpassungen des Untersuchungsablaufs | 24 |
| 10.0 | Ergebnisse | 25 |
| 10.1 | Gültigkeit des Tests..... | 25 |
| 10.2 | Indikator für mögliche falsche Funktionsfähigkeit | 25 |
| 10.3 | Zellenfunktionsfähigkeit | 26 |
| 11.0 | Diskussion und Schlussfolgerung | 27 |
| 12.0 | Referenzen | 28 |
| | ANHÄNGE | 29 |
| | ANHANG I: | |
| | KOPIE DES GLP-ZERTIFIKATS VON Toxi-Coop ZRT. | 1 Seite |
| | ANHANG II: | |
| | KOPIE DER TESTSYSTEM-QUALITÄTSKONTROLLE..... | 2 Seiten |
| | ANHANG III: | |
| | HISTORISCHE KONTROLLDATEN..... | 1 Seite |

| Liste der Tabellen | Seite |
|---|--------------|
| Tabelle 1: Im Experiment verwendete Chemikalien..... | 15 |
| Tabelle 2: Das EPISKIN-Vorhersagemodell | 23 |
| Tabelle 3: OD-Werte und Zellfunktionsprozentsätze der positiven und negativen Kontrolle..... | 26 |
| Tabelle 4: OD-Werte und Funktionsprozentsätze des Prüfgegenstands (einschl. berichtigtem Wert)..... | 26 |
| Tabelle 5: OD-Werte von zusätzlichen Kontrollen für MTT-interagierenden Prüfgegenstand..... | 26 |
| Tabelle 6: Historische Kontrolldaten | von Anw. III |

Folgende Ausdrücke dieses Berichts wurden herausgegeben:

Papierabzüge:

Original 1 von 2 Archiviert bei Toxi-Coop ZRT.
Original 2 von 2 Dem Sponsor übermittelt.

Elektronische Kopie:

Elektronische Kopie 1 von 1 Eine elektronische Kopie im PDF-Format wird dem Sponsor übermittelt.

Die elektronische Datei ist eine ungeprüfte Kopie, die nach Abschluss des Berichts erstellt wird. Der Sponsor wird darauf hingewiesen, dass PDF-Dateien keinen vollständigen Schutz vor Änderungen bieten. Daher kann Toxi-Coop ZRT. keinerlei Verantwortung für den Inhalt der elektronischen Kopie übernehmen. Der Sponsor verwendet die elektronische Kopie in eigener Verantwortung.

Untersuchungsnr.: 960-431 -5173

| |
|---|
| Erklärung des Untersuchungsleiters |
|---|

Diese Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit dem Untersuchungsablauf, den OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien (Nr. 431, 18. Juni 2019), der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission, Anhang Teil B, B.40Bis durchgeführt: „In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test“. Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L142 vom 31. Mai 2008, *INVITTOX*-Protokollnr. 118: „EPISKIN™ Skin Corrosivity Test“ (aktualisiert im Dezember 2011 / Februar 2012) und den Bestimmungen der „Good Laboratory Practice“, wie in der nationalen „Hungarian Good Laboratory Practice Regulation“ festgelegt: 42/2014 (VIII. 19.) EMMI-Erlass des „Minister of Human Capacities“, der dem OECD GLP, ENV/MC/CHEM(98)17 entspricht. Ich erkläre, dass dieser Bericht eine wahre Aufzeichnung der durchgeführten Maßnahmen und der in dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse darstellt.

Unterschrift: _____



István Buda

Date: _____

20 MARCH 2020

Untersuchungsnr.: 960-431-5173

Erklärung des Managements

Ich, der unterzeichnende Geschäftsführer, erkläre hiermit, dass die „In Vitro-Prüfung auf hautätzende Wirkung mit Wunderrein im EPISKIN-Modell“ gemäß dem vereinbarten Untersuchungsablauf in Toxi-Coop ZRT. durchgeführt wurde.

Signature: 
Dr. Gábor Hirka

Date: March 30, 2020

Untersuchungsnr.: 960-431-5173

| |
|-------------------------------------|
| Qualitätssicherungserklärung |
|-------------------------------------|

Untersuchungsnummer: **960-431-5173**

Untersuchungstitel: In Vitro-Prüfung auf hautätzende Wirkung mit Wunderrein im EPISKIN-Modell

Prüfgegenstand: **Wunderrein**

Diese Untersuchung wurde begutachtet und dieser Bericht von der Qualitätssicherung gemäß den Grundsätzen guter Laborpraxis geprüft. Soweit hinreichend festgelegt werden kann, spiegeln die beschriebenen Methoden und die in diesem Bericht enthaltenen Ergebnisse die während dieser Untersuchung gewonnenen Rohdaten genau wider.

Alle Begutachtungen, Datenüberprüfungen und die Prüfung des Berichts wurden dem Untersuchungsleiter und dem Management schriftlich mitgeteilt. Die Daten dieser Begutachtungen und der Prüfung des Berichts sind nachfolgend aufgeführt:

| Datum | Begutachtung/ Prüfung | Bericht an das Management | Bericht an den Untersuchungsleiter |
|-------------------|--|------------------------------|---------------------------------------|
| 2. Dezember 2019 | Untersuchungsablauf | 2. Dezember 2019 | 2. Dezember 2019 |
| 8.-9. August 2019 | Handhabung des Prüfgegenstands; Angemessenheit des Testsystems; Identifizierung; Behandlung; MTT-Test, Formazan-Extraktion; Probenmessung (prozessbasiert) | 9. August 2019 | 9. August 2019 |
| 10. Januar 2020 | Berichtsentwurf | 10. Januar 2020 | 10. Januar 2020 |
| 30. März 2020 | Abschlussbericht | 30. März 2020 | 30. März 2020 |

Unterschrift: Date: March 30, 2020

Alexandra Széles
Qualitätssicherung

| |
|--|
| Allgemeine Erklärungen und Verantwortlichkeiten |
|--|

| | |
|----------------------------------|--|
| Untersuchungstitel: | <i>In Vitro</i>-Prüfung auf hautätzende Wirkung mit Wunderrein im EPISKIN-Modell |
| Untersuchungsnummer: | 960-431-5173 |
| Sponsor: | PUROLEX Betriebshygiene & Gastroservice GmbH Mario Hofer Natschlag 47 4160 Aigen Schlägl Österreich |
| Untersuchungsüberwachung: | INVITRO-CONNECT GmbH Dr. Ute Hassmann Weitenunger Straße 42 77815 Bühl Deutschland |
| Testeinrichtung: | Toxi-Coop ZRT. 8230 Balatonfüred, Arácsi út 97-99. Ungarn Telefon: +36-30-678-2994 |
| Testmanagement: | Dr. Gábor Hirka |
| Untersuchungsleiter: | István Buda |
| Qualitätssicherung: | Ildikó Hermann Alexandra Széles |
| Technische Unterstützung: | Krisztina Fejes Pátkainé |

Untersuchungsablauf

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Untersuchungsbeginn: | 4. Dezember 2019 |
| Untersuchungsende: | 5. Dezember 2019 |
| Datum des Berichtsentwurfs: | 10. Januar 2020 |
| Datum des Abschlussberichts: | Montag, 30. März 2020 |

1.0 Zusammenfassung

Der EpiSkin™ SM-Test des Prüfgegenstands Wunderrein wurde durchgeführt, um sein Korrosionspotential durch Messung seiner zytotoxischen Wirkung vorherzusagen, wie im MTT-Test gemäß der OECD-Testrichtlinie Nr. 431 vom 18. Juni 2019 aufgezeigt.

Scheiben von EPISKIN (zwei Einheiten) wurden mit dem Prüfgegenstand behandelt und für 4 Stunden (± 10 Min.) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Einwirkung auf das Testmaterial wurde durch Spülen mit einer PBS 1x Lösung beendet. Die Funktionsfähigkeit jeder Scheibe wurde durch Inkubation der Gewebe für 3 Stunden (± 15 Minuten) mit MTT-Lösung bei 37 ± 1 °C in einem Inkubator mit $5 \pm 1\%$ CO₂ in einer $\geq 95\%$ befeuchteten und vor Licht geschützten Atmosphäre bewertet. Das abgeschiedene Formazan wurde dann unter Verwendung von angesäuertem Isopropanol extrahiert und spektrophotometrisch quantifiziert.

NaCl (9 g/l Kochsalzlösung) und mit Eisessig behandelte Epidermis wurden als negative bzw. positive Kontrollen verwendet.

Der Prüfgegenstand ist ein MTT-Reduzierer, daher wurden zusätzliche Kontrollen (mit dem Prüfgegenstand behandelte abgetötete Gewebe und mit Negativkontrolle behandelte abgetötete Gewebe) verwendet, um eine Störung der Funktionsfähigkeitsmessung durch die Testsubstanz festzustellen und zu korrigieren.

Für jedes behandelte Gewebe wurde die Funktionsfähigkeit als Prozentsatz relativ zur Negativkontrolle ausgedrückt. Der Prüfgegenstand gilt als nicht ätzend für die Haut, wenn die mittlere relative Funktionsfähigkeit nach 4 Stunden Einwirkung über oder gleich 35% der Negativkontrolle liegt.

Der Prüfgegenstand zeigte nach 4-stündiger Einwirkung keine signifikant verringerte Funktionsfähigkeit der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die durchschnittliche Funktionsfähigkeit des mit dem Prüfgegenstand behandelten Gewebes betrug 89% (korrigierte Werte) nach 4 Stunden Einwirkung. Die Funktionsfähigkeit des mit dem Prüfgegenstand behandelten Gewebes lag nach 4 Stunden Einwirkung über 35% des mittleren negativen Kontrollwerts.

Positive und negative Kontrollen zeigten, dass die erwarteten Zellfunktionswerte innerhalb akzeptabler Grenzen liegen.

Alle Test-Akzeptanzkriterien wurden erfüllt, das Experiment wurde als gültig angesehen.

Die in dieser *In Vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung mit dem EPISKIN-Modell (OECD 431) erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Prüfgegenstand unter den verwendeten Testbedingungen kein Hautkorrosionspotential aufweist. Zusammenfassend kann der Prüfgegenstand Wunderrein als nicht ätzend für die Haut eingestuft werden.

2.0 Untersuchungszweck und Einführung

Das Korrosivitätspotential einer Chemikalie kann durch Messung ihrer zytotoxischen Wirkung vorhergesagt werden, was sich im MTT-Test [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolylblau; CAS: 298-93-1] an der EPISKIN™-rekonstituierten menschlichen Epidermis widerspiegelt. Diese Methode ist von internationalen Aufsichtsbehörden als Ersatz für die Identifizierung von Ätzmitteln im *In Vivo*-Kaninchenhauttest (OECD 404) zugelassen und speziell als Ersatz für den *In Vivo*-Hautkorrosivitätstest innerhalb von OECD 431 zugelassen.

Der vorliegende Test basiert auf der Erfahrung, dass ätzende Chemikalien nach kurzfristiger Einwirkung des Stratum Corneum der Epidermis zytotoxische Wirkungen zeigen. Der Zweck dieser Untersuchung ist die Vorhersage des Hautkorrosivitätspotentials einer Chemikalie durch Bewertung ihrer Wirkung auf eine rekonstituierte menschliche Epidermis.

Das EPISKIN-Standardmodell™ ist ein dreidimensionales menschliches Hautmodell, das eine rekonstruierte Epidermis mit einem funktionellen Stratum Corneum umfasst. Die Verwendung für Hautkorrosivitätstests umfasst die topische Anwendung von Testmaterialien auf der Hautoberfläche und die anschließende Bewertung ihrer Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit der Zellen. Die Zytotoxizität wird als Verringerung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität ausgedrückt, gemessen durch Formazanproduktion aus MTT (Fentem *et al.*, 1998).

3.0 Behördliche Vorgaben und Testmethoden

Diese Untersuchung folgte den in den folgenden international anerkannten Richtlinien und Empfehlungen angegebenen Verfahren:

- OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien, Abschnitt 4, Nr. 431, „In Vitro Skin Corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method“, verabschiedet am 18. Juni 2019.
- Verordnung der Kommission (EG) Nr. 440/2008, Anhang Teil B, B.40Bis: „In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test“, Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L142 vom 31. Mai 2008.
- *INVITTOX*-Protokoll Nr. 118; „EPISKIN™ Skin Corrosivity Test“, aktualisiert im Dezember 2011 / Februar 2012 (ECVAM-Datenbankdienst zu Alternativmethoden zu Tierversuchen).

4.0 Archivierung

Die unten aufgeführten Untersuchungsdokumente und Proben werden gemäß den OECD GLP und den Toxi-Coop Zrt. SOPs in den Archiven von Toxi-Coop Zrt. archiviert (H-8230 Balatonfüred, Galamb u. 12/A., Ungarn):

- Untersuchungsablauf und jegliche Ergänzungen (15 Jahre)
- Alle Rohdaten (15 Jahre)
- Aufbewahrte Probe des Prüfgegenstands und des Referenzgegenstands (5 Jahre)
- Korrespondenz (15 Jahre)
- Untersuchungsbericht und jegliche Ergänzungen (15 Jahre)

Nach Ablauf der Aufbewahrungszeit werden alle oben aufgeführten archivierten Materialien an den Sponsor zurückgesandt oder für einen weiteren Zeitraum aufbewahrt, wenn dies vertraglich vereinbart wurde, oder sie werden in dessen Auftrag vernichtet. Keine der oben genannten Dokumente oder Materialien werden ohne das ausdrückliche schriftliche Einverständnis des Sponsors entsorgt.

Am Ende der Untersuchung werden alle verbleibenden Testgegenstände entsorgt, sofern der Sponsor nichts anderes anweist.

5.0 Materialien und Methoden

5.1 Prüfgegenstand

5.1.1 Name und Daten des Prüfgegenstands

| | |
|--------------------------|---|
| Name des Prüfgegenstands | Wunderrein |
| Chargenr. | Produktion vom 10.10.2019 |
| Aussehen | weiße, cremige Substanz (in kaltem Zustand) flüssig und klar (in erhitztem Zustand) |
| Ablaufdatum | 29. Oktober 2021 (24 Monate nach dem Öffnen) |
| Lagerung | Raumtemperatur |

5.1.2 Identifizierung, Erhalt

Der Prüfgegenstand mit geeigneter chemischer Reinheit wurde vom Sponsor geliefert. Alle zur Handhabung und Entsorgung des Prüfgegenstands erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen wurden vom Sponsor erläutert und mit den Rohdaten archiviert.

Die Identifizierung des Prüfgegenstands wurde im Labor von Toxi-Coop ZRT. basierend auf den Informationen des Sponsors durchgeführt.

5.1.3 Rezeptur

Der Prüfgegenstand wurde in seiner ursprünglichen Form angewendet, es wurde keine Rezeptur benötigt. Der Prüfgegenstand wurde jedoch in einem Inkubator vorgewärmt, bevor die erforderliche Menge des Prüfgegenstands gemessen und auf folgende Weise angewendet wurde:

Verwendetes Vorwärmverfahren für die Prüfmethode zur möglichen direkten MTT-Reduzierung mit dem Prüfgegenstand und Prüfmethode zur Ermittlung des Farbpotentials des Prüfgegenstands:

Der Inkubator wurde auf 37 °C vorgewärmt, bevor das Kunststoffröhrchen mit dem Prüfgegenstand hineingetan wurde. Das Kunststoffröhrchen mit dem Prüfgegenstand befand sich ungefähr eine Stunde im Inkubator und danach wurde es entfernt und ca. 50µl bzw. 10µl des Prüfgegenstands wurden aus dem vorgewärmten Behälter abgemessen, die für die Kontrolltests verwendet werden sollten.

Verwendetes Vorwärmverfahren für die Behandlung:

Der Inkubator wurde auf 37 °C vorgewärmt, bevor das Kunststoffröhrchen mit dem Prüfgegenstand hineingetan wurde. Das Kunststoffröhrchen mit dem Prüfgegenstand befand sich ungefähr eine Stunde im Inkubator und danach wurde es entfernt und ca. 50µl des Prüfgegenstands wurden aus dem vorgewärmten Behälter abgemessen, die für jedes mit dem Prüfgegenstand behandelte Gewebe verwendet werden sollten.

5.2 Kontrollen

Positive und negative Kontrollen wurden gleichzeitig im Experiment eingesetzt.

5.2.1 Negative Kontrolle

NaCl (9 g/l Kochsalzlösung):

Natriumchlorid:

Lieferant: lach:ner
Chargenr.: PP/2018/05962
Wiederholungstest: 31. Januar 2021
Lagerbedingung: Raumtemperatur

Verdünnt mit ultrareinem Wasser (hergestellt von MILLIPORE Synergy UV HF ASTM 1: F8JA80461C Wasseraufbereitungssystem) bei Toxi-Coop ZRT.

5.2.2 Positive Kontrolle

Eisessig:

Lieferant: MERCK
Chargenr.: STBG9991
Wiederholungstest: April 2022
Lagerbedingung: Raumtemperatur

5.3 Weitere Materialien

5.3.1 MTT-Stammlösung

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolylblau; CAS-Nummer 298-93-1] wurde bis zu einer Endkonzentration von 3 mg/ml in Kochsalzpuffer (1x PBS) gelöst. Die erhaltene Stammlösung kann bis zu 15 Tage lichtgeschützt im Kühlschrank (2-8 °C) gelagert werden.

5.3.2 MTT-Fertiglösung

Die MTT-Stammlösung wurde mit einem vorgewärmten „Testmedium“ auf eine Endkonzentration von 0,3 mg/ml verdünnt. Die erhaltene Lösung wurde innerhalb von zwei Stunden verwendet; vor Gebrauch war sie vor Licht geschützt.

5.3.3 Angesäuertes Isopropanol

Isopropanol wurde mit HCl-Säure auf eine Endkonzentration von 0,04 N HCl verdünnt. Die erhaltene Lösung kann für einen Monat lichtgeschützt im Kühlschrank (2-8 °C) gelagert werden.

5.3.4 Im Experiment verwendete Chemikalien

Die im Experiment verwendeten Chemikalien sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 1: Im Experiment verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Lieferant/Hersteller | Los- /Chargennummer | Wiederholungstest /Ablaufdatum |
|-------------|----------------------|------------------------|-----------------------------------|
| MTT | SIGMA-ALDRICH | MKCG3023 | September 2023 |
| Isopropanol | SIGMA-ALDRICH | BCBZ5307 | 8. Juli 2020 |
| HCl | CARLO ERBA | V3N459023N | Dezember 2019 |
| 10x PBS* | SIGMA-ALDRICH | SLBX1610 | März 2020 |

* 1x PBS wird durch angemessenes Verdünnen mit ultrareinem Wasser hergestellt (hergestellt von MILLIPORE Synergy UV HF ASTM 1: F8JA80461C Wasseraufbereitungssystem) bei Toxi-Coop ZRT.

5.4 Testsystem

5.4.1 Menschliche Haut

EpiSkin™ Small-Modell (EpiSkin™SM), EPISKIN SNC Lyon, Frankreich, ist ein dreidimensionales menschliches Epidermis-Modell. Erwachsene vom Menschen stammende epidermale Keratinozyten werden auf einem Hautersatz verteilt, der aus einer Kollagen-Typ-I-Matrix besteht, die mit Typ-IV-Kollagen beschichtet ist. Nach 13-tägiger Kulturperiode erhält man ein hoch differenziertes und geschichtetes Epidermismodell, das die wichtigsten Basal-, Suprabasal-, Stachel- und Körnerzellschichten sowie ein funktionelles Stratum Corneum umfasst (Tinois *et al.*, 1994). Die Verwendung für Hautkorrosivitätstests umfasst die topische Anwendung von Testmaterialien auf der Oberfläche der Epidermis und die anschließende Bewertung ihrer Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit der Zellen.

Lieferant: EPISKIN Laboratories
4, rue Alexander Fleming, 69366 Lyon Cedex 07 – Frankreich
Chargennr.: 19-EKIN-049
Ablaufdatum: 9. Dezember 2019

5.4.2 Rechtfertigung des gewählten Testsystems

Das EPISKIN-Modell wurde in einer internationalen Studie für Korrosivitätstests validiert. Es wird als für diese Untersuchung geeignet angesehen (ERKLÄRUNG ZUR WISSENSCHAFTLICHEN GÜLTIGKEIT DES EPISKIN™-TESTS (EIN *IN VITRO*-TEST AUF HAUTKORROSIVITÄT); ECVAM JRC Umweltinstitut, Europäische Kommission; Ispra; 3. April 1998).

5.4.3 Leistungsnachweis

Nach Standardanwendung der Methode demonstrierte Toxi-Coop ZRT. den technischen Nachweis in einer separaten Untersuchung (Untersuchungsnr.: 392-431-4224) unter Verwendung der zwölf Nachweischemikalien gemäß OECD-Prüfrichtlinie Nr. 431.

5.4.4 Qualitätskontrolle

EPISKIN-SM-Kits werden entsprechend festgelegten Qualitätssicherungsverfahren hergestellt (ISO 9001-zertifiziert). Alle biologischen Komponenten der Epidermis und des Kit-Kulturmediums wurden auf das Vorhandensein von Viren, Bakterien und Mykoplasmen getestet. Die Qualität des Endprodukts wird durch Durchführung eines MTT-Zellfunktionstests und eines Zytotoxizitätstests mit Natriumdodecylsulfat (SDS) bewertet.

5.4.5 EpiSkin™SM KIT-Inhalte

Einheiten: EpiSkin™SM-Platte enthält bis zu 12 rekonstruierte Epidermis-Einheiten (Bereich: 0,38 cm²). Jede rekonstruierte Epidermis wird mit einem O-Ring-Set an der Basis eines Gewebekulturgefäßes befestigt und zum Transport auf nahrhaftem Agar gehalten.

Platte: Testplatte mit 12 Vertiefungen

Stanzung: EpiSkin™SM-Biopsiestanzung zur einfachen Probenahme von Epidermis

Medium: Ein Kolben mit sterilem „Trägermedium“ für Inkubationen (Chargenr.: 19-MAIN3-057; Ablaufdatum: 11. Dezember 2019).

Ein Kolben mit sterilem „Testmedium“ zur Anwendung des Prüfgegenstands und zur Verwendung in MTT-Tests (Chargenr.: 19-ESSC-051; Ablaufdatum: 11. Dezember 2019).

5.4.6 Anzahl der Wiederholungen

In diesem Test wurden 2 Wiederholungen pro Prüfgegenstand und 2 Wiederholungen der Negativkontrolle sowie 2 Wiederholungen der Positivkontrolle verwendet. Zusätzlich wurden 2 abgetötete mit dem Prüfgegenstand behandelte Gewebe und 2 abgetötete mit der Negativkontrolle behandelte Gewebe für die MTT-Bewertung verwendet.

5.4.7 EpiSkinTMSM KIT-Erhaltsverfahren

Die Farbe des Agarmediums für den Transport wurde auf seinen pH-Wert geprüft.

- orange Farbe = gut
- gelbe oder violette Farbe = inakzeptabel

Die Farbe des Temperaturindikators wurde überprüft, um sicherzustellen, dass das Kit keiner Temperatur über 40 °C ausgesetzt war:

- der Indikator wechselt bei 40 °C von weiß auf

grau Das Kit war bei Empfang in gutem Zustand.

5.4.8 EpiSkinTMSM KIT-Lagerung

Die EpiSkinTMSM-Einheiten wurden bei Raumtemperatur in ihrer Verpackung aufbewahrt, bis die Vorinkubation gestartet wurde. Die Träger- und Testmedien wurden bei 2-8 °C aufbewahrt.

5.5 Indikator für mögliche falsche Funktionsfähigkeit

Die optischen Eigenschaften des Prüfgegenstands oder seine chemische Wirkung auf MTT können den Test beeinträchtigen und zu einer falschen Einschätzung der Funktionsfähigkeit führen. Dies kann auftreten, wenn der Prüfgegenstand durch Spülen nicht vollständig aus dem Gewebe entfernt wird oder wenn er in die *Epidermis* eindringt. Wenn das Testmaterial direkt auf MTT (MTT-Reduzierer) einwirkt, von Natur aus gefärbt ist oder während der Gewebebehandlung gefärbt wird, sollten zusätzliche Kontrollen verwendet werden, um eine Störung der Funktionsfähigkeitsmessung durch den Prüfgegenstand zu erkennen und zu korrigieren.

5.5.1 Prüfmethode für mögliche direkte MTT-Reduzierung beim Prüfgegenstand

Der Prüfgegenstand wurde vorgewärmt (siehe Abschnitt 5.1.3) und danach wurden ca. 50 µl des Prüfgegenstands zu 2 ml MTT 0,3 mg/ml Lösung hinzugegeben und gemischt. Das Gemisch wurde drei Stunden bei 37 ± 1 °C inkubiert (lichtgeschützt) und dann jede Farbänderung beobachtet:

- Prüfgegenstände, die nicht mit MTT interagieren: gelb
- Prüfgegenstände, die mit MTT interagieren: blau oder lila

Wenn die Farbe der MTT-Lösung blau oder lila wird, interagiert die Testsubstanz mit dem MTT. Dann muss der Teil der optischen Dichte (OD) aufgrund der unspezifischen Verringerung des MTT (d. H. unter Verwendung der abgetöteten Epidermis) bewertet werden.

Der Prüfgegenstand wies eine direkte Interaktion mit dem MTT auf. Die Verwendung zusätzlicher Kontrollen war nötig.

Zusätzliche Kontrollen für direkt mit dem MTT interagierende Chemikalien (MTT-Reduzierer):

Zusätzlich zum normalen Verfahren wurden 2 mit dem Prüfgegenstand behandelte abgetötete Gewebe und 2 mit Negativkontrolle behandelte abgetötete Gewebe für die MTT-Bewertung in einem Lauf verwendet (unbehandelte abgetötete Gewebe können eine geringe Restaktivität im Zusammenhang mit NADH und Dehydrogenase aufweisen). Die Charge der abgetöteten Gewebe unterschied sich von den Chargen der lebenden Gewebe (Chargennr. der abgetöteten Epidermis: 19-EKIN-040). Für diese Gewebe werden die gleichen Behandlungsschritte befolgt wie für die lebenden Gewebe.

Durch Wasser abgetötete Epidermis für MTT-Interaktionselemente:

- Die lebende Epidermis wird mit 2 ml destilliertem Wasser (anstatt des Kulturmediums) in eine Platte mit 12 Vertiefungen gelegt.
- Bei 37 °C inkubieren, 5 % CO₂, ≥ 95 % befeuchtete Atmosphäre für 48 Std. +/- 1 Stunde. Nach der Inkubation das Wasser entsorgen.
- Tote Epidermis im Gefrierschrank bei -18 °C bis -20 °C gefroren (trocken) aufbewahren (abgetötete Epidermis kann bis zu 6 Monate gelagert und verwendet werden).
- Vor der Verwendung werden die abgetöteten Gewebe bei Raumtemperatur (ca. 1 Stunde in 2 ml Trägermedium) aufgetaut.
- Die weitere Verwendung von abgetöteten Geweben

ähnelt der von lebenden Geweben. Die Ergebnisse dieses

Prüftests sind in Abschnitt 10.2 aufgeführt.

5.5.2 Prüfmethode zur Ermittlung des Farbpotentials des Prüfgegenstands

Vor der Behandlung wurde der Prüfgegenstand auf seine eigentliche Farbe oder seine Fähigkeit, bei Kontakt mit Wasser gefärbt zu werden, bewertet (Simulation einer feuchten Umgebung des Gewebes).

Der Prüfgegenstand wurde vorgewärmt (siehe Abschnitt 5.1.3) und danach wurden ca. 10 µl des Prüfgegenstands zu 90 µl Wasser hinzugegeben und gemischt (hergestellt bei Toxi-Coop ZRT. durch MILLIPORE Synergy UV HF ASTM 1: F8JA80461C Wasseraufbereitungssystem). Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten geschüttelt und dann auf seine Farbe geprüft (mit bloßem Auge).

Die Ergebnisse dieses Prüftests sind in Abschnitt 10.2 aufgeführt.

6.0 Beschreibung des Testverfahrens

6.1 Vorinkubation

Das „Trägermedium“ wurde auf 37 °C vorgewärmt. Die geeignete Anzahl von Testplattenvertiefungen wurde mit dem vorgewärmten Medium gefüllt (2 ml pro Vertiefung). Die Epidermisenheiten wurden mit den Medien darunter in Kontakt mit der Epidermis in jede vorbereitete Vertiefung gebracht und dann über Nacht bei 37 ± 1 °C in einem Inkubator mit $5 \pm 1\%$ CO₂ in einer $\geq 95\%$ befeuchteten Atmosphäre inkubiert.

6.2 Anwendung

Vor der Anwendung wurden die Hauteinheiten in ein vorgewärmtes „Testmedium“ gegeben (37 °C; 2 ml pro Vertiefung).

Zwei Wiederholungen wurden für den Prüfgegenstand bzw. die Kontrolle(n) verwendet.

Prüfgegenstand

Der Prüfgegenstand wurde vor der Behandlung vorgewärmt (siehe Abschnitt 5.1.3) und danach wurden jeweils ca. 50 µl des Prüfgegenstands gleichmäßig auf die epidermale Oberfläche der beiden Testhauteinheiten aufgetragen. Der Prüfgegenstand kann vorsichtig mit der Pipettenspitze verteilt werden, um bei Bedarf die gesamte Epidermisoberfläche gleichmäßig zu bedecken.

Positive und negative Kontrolle

Ein Volumen von 50 µl Positivkontrolle (Eisessig) oder Negativkontrolle (NaCl 9 g/l) wurde unter Verwendung einer geeigneten Pipette auf die Hautoberfläche aufgebracht. Die Chemikalien wurden vorsichtig mit der Pipettenspitze verteilt, um bei Bedarf die gesamte Epidermisoberfläche gleichmäßig zu bedecken.

Zusätzliche Kontrollen für direkt mit dem MTT interagierende Chemikalien

Zusätzlich zum normalen Verfahren wurden 2 mit dem Prüfgegenstand behandelte abgetötete Gewebe und 2 mit Negativkontrolle behandelte abgetötete Gewebe für die MTT-Bewertung in einem Lauf verwendet.

6.3 Einwirkung

Die Platten mit den behandelten Epidermisenheiten wurden für die Einwirkungszeit von 4 Stunden (± 10 Min.) bei Raumtemperatur (23,2-24,4 °C) inkubiert.

6.4 Spülen

Nach der Inkubationszeit wurden die EpiSkinTMS_M-Einheiten gründlich mit ca. 25 ml 1x PBS-Lösung gespült, um den Prüfgegenstand von der epidermalen Oberfläche zu entfernen. Der Rest des PBS wurde mit einer geeigneten Pipettenspitze, die mit einer Vakuumquelle verbunden war, von der Epidermisoberfläche entfernt (es wurde darauf geachtet, eine Schädigung der Epidermis zu vermeiden).

6.5 MTT-Test

Um die Einwirkung mit dem Prüfgegenstand zu beenden, wurden die EpiSkinTMSM-Einheiten mit PBS gespült. Danach wurden die EpiSkinTMSM-Einheiten in die mit der MTT-Lösung gefüllten Vertiefungen überführt (2 ml von 0,3 mg/ml MTT pro Vertiefung), und dann lichtgeschützt für 3 Stunden (± 15 Min.) bei 37 ± 1 °C in einem Inkubator mit $5 \pm 1\%$ CO₂ in einer $\geq 95\%$ befeuchteten Atmosphäre inkubiert.

6.6 Formazan-Extraktion

Nach der Inkubation mit MTT wurde eine Formazan-Extraktion durchgeführt:

Eine Epidermisscheibe wurde mit einer Biopsiestanzung (im Lieferumfang des Kits enthalten) aus der Einheit herausgeschnitten (die maximale Fläche der Scheibe). Die Epidermis wurde mithilfe einer Pinzette abgetrennt und beide Teile (Epidermis und Kollagenmatrix) wurden in ein Röhrchen mit 500 μ l angesäuertem Isopropanol (ein Röhrchen pro Vertiefung der Gewebekulturplatte) gegeben.

Die verschlossenen Röhrchen wurden unter Verwendung eines Vortexmischers gründlich gemischt, um einen guten Kontakt des gesamten Materials mit dem angesäuerten Isopropanol zu erreichen, und dann über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt für die Formazan-Extraktion inkubiert. Nach der Inkubationsperiode wurde jedes Röhrchen nochmals mit einem Vortexmischer durchmischt, um die Extraktion zu verbessern.

6.7 Messungen der Zellenfunktionsfähigkeit

Nach der Formazan-Extraktion wurde eine 2×200 μ l Probe aus jedem Röhrchen in die Vertiefungen einer Platte mit 96 Vertiefungen (entsprechend gekennzeichnet) gegeben und die OD (Absorption / optische Dichte) der Proben mit einem Spektralphotometer (Thermo Scientific; Multiscan FC) bei 570 nm (± 10 nm; Auslesebereich: 0-3,5 Abs, Linearitätsbereich: 0,2908-2,6589) ausgelesen, unter Verwendung von angesäuerter Isopropanollösung als Blindprobe (6×200 μ l).

Auswertung der Versuchsdaten

7.1 Berechnungen der Funktionsfähigkeitsprozentsätze

Die Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt.

Blindprobe:

- Der Mittelwert der 6 Blind-OD-Werte wurde berechnet.

Negative Kontrolle:

- Die einzelnen Negativkontroll-OD-Werte wurden mit dem mittleren Blind-OD-Wert korrigiert.

$$OD \text{ Negative Kontrolle } (OD_{NK1}) = OD_{NKroh1} - OD_{blind \text{ mittel}}$$

$$OD \text{ Negative Kontrolle } (OD_{NK2}) = OD_{NKroh2} - OD_{blind \text{ mittel}}$$

$$\text{Mittlere OD Negative Kontrolle (mittlere } OD_{NK}) = [(OD_{NK1}) + (OD_{NK2})] / 2$$

- Die korrigierte mittlere OD der 2 negativen Kontrollwerte wurde berechnet: dies entspricht einer 100-prozentigen Funktionsfähigkeit.

Positive Kontrolle:

- Die einzelnen Positivkontroll-OD-Werte wurden mit dem mittleren Blind-OD-Wert korrigiert.

$$OD \text{ Positive Kontrolle } (OD_{PK}) = OD_{PKroh} - OD_{blind \text{ mittel}}$$

- Die korrigierte mittlere OD der 2 positiven Kontrollwerte wurde berechnet.
- Die prozentuale Funktionsfähigkeit für jedes positive Kontrollreplikat wurde relativ zur mittleren Negativkontrolle berechnet:

$$\% \text{ Positive Kontrolle } 1 = (OD_{PK1} / \text{mittlere } OD_{NK}) \times 100$$

$$\% \text{ Positive Kontrolle } 2 = (OD_{PK2} / \text{mittlere } OD_{NK}) \times 100$$

- Der Mittelwert der 2 einzelnen Funktionsprozentwerte für die positive Kontrolle wurde berechnet:

$$\text{Mittlerer PK } \% = (\% \text{ PK1} + \% \text{ PK2}) / 2$$

Prüfgegenstand:

- Die einzelnen Prüfgegenstand-OD-Werte wurden mit dem mittleren Blind-OD-Wert korrigiert:

$$OD \text{ Behandeltes Gewebe } (OD_{BG}) = OD_{BGroh} - OD_{blind \text{ mittel}}$$

- Die korrigierte mittlere OD der 2 Prüfgegenstandswerte wurde berechnet.
- Die prozentuale Funktionsfähigkeit für jedes Prüfgegenstandsreplikat wurde relativ zur mittleren Negativkontrolle berechnet:

$$\% \text{ Behandeltes Gewebe } 1 = (OD_{BG1} / \text{mittlere } OD_{NK}) \times 100$$

$$\% \text{ Behandeltes Gewebe } 2 = (OD_{BG2} / \text{mittlere } OD_{NK}) \times 100$$

- Der Mittelwert der 2 einzelnen Funktionsprozentwerte für den Prüfgegenstand wurde berechnet:

$$\text{Mittlerer BG } \% = (\% \text{ BG1} + \% \text{ BG2}) / 2$$

7.2 Datenberechnung für MTT-interagierende Elemente

Prüfgegenstände, die die MTT beeinträchtigen, können zu einer nicht-spezifischen Reduzierung der MTT führen. Die OD muss aufgrund nicht-spezifischer Reduktion bewertet und subtrahiert werden, bevor die Funktionsprozentwerte berechnet werden können.

- Nicht-spezifische MTT-Reduktionsberechnung (NSMTT):

$$\text{Gewebe 1 NSMTT}_1 \% = [(OD_{AG1} - \text{mittlere } OD_{ANK}) / \text{mittlere } OD_{NK}]$$

$$\times 100 \text{ Gewebe 2 NSMTT}_2 \% = [(OD_{AG2} - \text{mittlere } OD_{ANK}) / \text{mittlere}$$

$$OD_{NK}] \times 100 \text{ mittlere NSMTT}\% = (\text{NSMTT}_1 \% + \text{NSMTT}_2 \%)/2$$

OD_{ANK} : OD abgetöteter, mit negativer Kontrolle behandelter Gewebe (ähnliche Berechnungen wie für mittlere OD_{NK})

OD_{AG} : OD abgetöteter, mit Prüfgegenstand behandelter Gewebe (Mittelwert)

OD_{NK} : OD Negative Kontrolle

Wenn $NSMTT \% > 50 \%$ relativ zur negativen Kontrolle ist: Wenn möglich müssen zusätzliche Schritte unternommen werden, oder der Prüfgegenstand muss als mit dem Test nicht kompatibel angesehen werden.

- Eine echte MTT-Stoffwechsellumwandlung (TOD_{TT}) wird durchgeführt, wenn die NSMTT $\leq 50\%$ ist:

$$TOD_{TT} = [OD_{TT} - (\text{mittlere } OD_{AG} - \text{mittlere } OD_{ANK})]$$

OD_{TT} : mit Prüfgegenstand behandelte funktionsfähige Gewebe

- Die prozentuale relative Funktionsfähigkeit (% RV) für jedes Prüfgegenstandsreplikat wird relativ zur mittleren Negativkontrolle berechnet:

$$\% RV 1 = [TOD_{TT1} / \text{mittlere } OD_{NK}] \times 100$$

$$\% RV 2 = [TOD_{TT2} / \text{mittlere } OD_{NK}] \times 100$$

- Der Mittelwert der 2 einzelnen relativen Funktionsprozentwerte für den Prüfgegenstand wird berechnet:

$$\text{Mittlerer relativer Funktionsprozentwert} = (\% RV 1 + \% RV 2) / 2$$

7.3 Test-Akzeptanzkriterien

- Der mittlere OD-Wert der beiden Negativkontrolle-Gewebe sollte zwischen 0,6 und 1,5 liegen.
- Die akzeptable prozentuale Funktionsfähigkeit für die Positivkontrolle (jedes der beiden Gewebe) beträgt 0 bis 20% (gemäß der von ECVAM validierten Herstellerspezifikation (Fentem *et al.*, 1998)).
- Im Bereich einer 20- bis 100-prozentigen Funktionsfähigkeit und für OD-Werte $\geq 0,3$, sollte der Unterschied der Funktionsfähigkeit der beiden Gewebereplikate 30% nicht überschreiten.

7.4 Interpretation der Testergebnisse

Das folgende Vorhersagemodell entspricht den von den EU-Aufsichtsbehörden gemäß dem INVITTOX-Protokoll Nr. 118 („EPISKINTM Skin Corrosivity Test“, aktualisiert im Dezember 2011 / Februar 2012) vereinbarten Methoden.

Der Grenzwert von 35% und die Klassifizierungsmethode wurden in einer internationalen Validierung dieses Kits validiert (Fentem *et al.*, 1998).

Die Interpretation der Testergebnisse ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 2: Das EPISKIN-Vorhersagemodell

| Klassifizierung | Verpackungsgruppe / Klassifizierungskateg. | Kriterien für <i>In Vitro</i> -Interpretation |
|-----------------|--|---|
| UN | Ätzend: Optionale Sub- Kategorie 1A | Mittlere Gewebefunktion ist < 35% nach 3 Min. Einwirkung |
| | Ätzend: Optionale Sub- Kategorie 1B und 1C | Mittlere Gewebefunktion ist $\geq 35\%$ nach 3 Min. Einwirkung und < 35% nach 1 Stunde Einwirkung ODER Mittlere Gewebefunktion ist $\geq 35\%$ nach 1 Stunde Einwirkung und < 35% nach 4 Stunden Einwirkung |
| | Nicht ätzend: | Mittlere Gewebefunktion ist $\geq 35\%$ nach 4 Stunden Einwirkung |

8.0 Abweichungen des Untersuchungsablaufs

| | |
|---|--|
| Nr. 1: | |
| Betrifft: | Datum des Abschlussberichts |
| Entspr. dem Untersuchungsablauf: | nicht später als 4 Wochen nach Revision und Korrektur des Berichtsentwurfs |
| Abweichung: | Der Abschlussbericht ist später als 4 Wochen nach Revision und Korrektur des Berichtsentwurfs verfügbar |
| Grund: | Ungeplante Verzögerung |
| Erwartete Auswirkung auf Untersuchung: | Keine |

9.0 Anpassungen des Untersuchungsablaufs

Es gab keine Anpassungen am Untersuchungsablauf.

10.0 Ergebnisse

10.1 Gültigkeit des Tests

- Der mittlere OD-Wert der beiden Negativkontrolle-Gewebe betrug 0,987.
- Das Ergebnis der positiven Kontrolle wies 5% Funktionsfähigkeit aus.
- Der Funktionsunterschied zwischen den beiden Gewebereplikaten:
 - Negative Kontrolle: 10,1 %
 - Positive Kontrolle: 5,1 %
 - Prüfgegenstand: 3,8 %

Alle Gültigkeitskriterien lagen innerhalb akzeptabler Grenzen und daher kann die Untersuchung als gültig angesehen werden.

10.2 Indikator für mögliche falsche Funktionsfähigkeit

Mögliche direkte MTT-Reduzierung beim Prüfgegenstand:

Bei der Prüfmethode für eine mögliche direkte MTT-Reduzierung wurde nach drei Stunden Inkubation eine Farbänderung beobachtet. Der Prüfgegenstand hat mit dem MTT interagiert, deshalb waren zusätzliche Kontrollen und Datenberechnungen erforderlich.

Die nicht-spezifische MTT-Reduktion (NSMTT) wurde als 4,741% ermittelt. Da die NSMTT unter 50% lag, wurde in allen Fällen die echte MTT-Stoffwechselumwandlung durchgeführt und die prozentuale Funktionsfähigkeit korrigiert.

Färbungspotenzial des Prüfgegenstands:

Der Prüfgegenstand zeigte keine Eigenschaften, sich bei Kontakt mit Wasser zu färben. Die Eigenfarbe des Testobjekts ist weiß und wird daher als nicht in der Lage angesehen, das Gewebe signifikant zu färben und zu einer falschen Einschätzung der Funktionsfähigkeit zu führen. Außerdem wurde der Prüfgegenstand während des Spülens vollständig von der Epidermisoberfläche entfernt. Zusätzliche Kontrollen und Datenberechnungen waren nicht erforderlich. Eine Falscheinschätzung der Funktionsfähigkeit kann ausgeschlossen werden.

10.3 Zellenfunktionsfähigkeit

Die Ergebnisse der bei 570 nm jedes Replikats gemessenen optischen Dichte (OD) und der berechneten prozentualen Funktionsfähigkeit der Zellen sind nachstehend dargestellt:

Tabelle 3: OD-Werte und Zellfunktionsprozensätze der positiven und negativen Kontrolle:

| Kontrollen | Optische Dichte (OD) | | Funktionsf. (%) | $\Delta\%$ |
|--|----------------------|--------------|-----------------|------------|
| Negative Kontrolle: NaCl (9 g/l Kochsalzlösung) | 1 | 1,037 | 105 | 10,1 |
| | 2 | 0,937 | 95 | |
| | Mittel | 0,987 | 100 | |
| Positive Kontrolle: Eisessig | 1 | 0,078 | 8 | 5,1 |
| | 2 | 0,028 | 3 | |
| | Mittel | 0,053 | 5 | |

Tabelle 4: OD-Werte und Funktionsprozensätze des Prüfgegenstands (einschl. berichtigen Werten):

| Prüfgegenstand | Optische Dichte (OD) | | TOD_{IT} | Funktionsf. (%) | Relative Funktionsf. (%) | $\Delta\%$ |
|----------------|-------------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------------------|------------|
| Wunderrein | 1 | 0,941 | 0,894 | 95 | 91 | 3,8 |
| | 2 | 0,903 | 0,857 | 92 | 87 | |
| | Mittel | 0,922 | 0,875 | 93 | 89 | |
| | Standardabweichung (SD) | | | 2,66 | 2,66 | |

Tabelle 5: OD-Werte von zusätzlichen Kontrollen für MTT-interagierenden Prüfgegenstand:

| Zusätzliche Kontrollen | Optische Dichte (OD) | |
|--|----------------------|--------------|
| Mit Negativkontrolle behandelte abgetötete Gewebe: NaCl (9 g/l Kochsalzlösung) | 1 | 0,057 |
| | 2 | 0,055 |
| | Mittel | 0,056 |
| Mit Prüfgegenstand behandelte abgetötete Gewebe: Wunderrein | 1 | 0,097 |
| | 2 | 0,108 |
| | Mittel | 0,103 |

Anmerkung: $\Delta\%$: Der Funktionsunterschied zwischen den beiden verbundenen Geweben:

TOD_{IT} : echte MTT-Stoffwechsellumwandlung

Mittlerer Blindwert betrug 0,0402

11.0 Diskussion und Schlussfolgerung

Scheiben von EPISKIN (zwei Einheiten) wurden mit dem Prüfgegenstand behandelt und für 4 Stunden (± 10 Min.) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Einwirkung auf das Testmaterial wurde durch Spülen mit einer PBS 1x Lösung beendet. Die Funktionsfähigkeit jeder Scheibe wurde durch Inkubation der Gewebe für 3 Stunden (± 15 Minuten) mit MTT-Lösung bei 37 ± 1 °C in einem Inkubator mit $5 \pm 1\%$ CO₂ in einer $\geq 95\%$ befeuchteten und vor Licht geschützten Atmosphäre bewertet. Das abgeschiedene Formazan wurde dann unter Verwendung von angesäuertem Isopropanol extrahiert und spektrophotometrisch quantifiziert.

NaCl (9 g/l Kochsalzlösung) und mit Eisessig behandelte Epidermis wurden als negative bzw. positive Kontrollen verwendet.

Der Prüfgegenstand ist ein MTT-Reduzierer, daher wurden zusätzliche Kontrollen (mit dem Prüfgegenstand behandelte abgetötete Gewebe und mit Negativkontrolle behandelte abgetötete Gewebe) verwendet, um eine Störung der Funktionsfähigkeitsmessung durch die Testsubstanz festzustellen und zu korrigieren.

Für jedes behandelte Gewebe wurde die Funktionsfähigkeit als Prozentsatz relativ zur Negativkontrolle ausgedrückt. Der Prüfgegenstand gilt als nicht ätzend für die Haut, wenn die mittlere relative Funktionsfähigkeit nach 4 Stunden Einwirkung über oder gleich 35% der Negativkontrolle liegt.

Der Prüfgegenstand zeigte nach 4-stündiger Einwirkung keine signifikant verringerte Funktionsfähigkeit der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die durchschnittliche Funktionsfähigkeit des mit dem Prüfgegenstand behandelten Gewebes betrug 89% (korrigierte Werte) nach 4 Stunden Einwirkung. Die Funktionsfähigkeit des mit dem Prüfgegenstand behandelten Gewebes lag nach 4 Stunden Einwirkung über 35% des mittleren negativen Kontrollwerts.

Positive und negative Kontrollen zeigten, dass die erwarteten Zellfunktionswerte innerhalb akzeptabler Grenzen liegen.

Alle Test-Akzeptanzkriterien wurden erfüllt, das Experiment wurde als gültig angesehen.

Die in dieser *In Vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung mit dem EPISKIN-Modell (OECD 431) erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Prüfgegenstand unter den verwendeten Testbedingungen kein Hautkorrosionspotential aufweist. Zusammenfassend kann der Prüfgegenstand Wunderrein als nicht ätzend für die Haut eingestuft werden.

12.0 Referenzen

1. OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien, Abschnitt 4, Nr. 431, „In Vitro Skin Corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method“, verabschiedet am 18. Juni 2019.
2. OECD-Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP), vom Rat am 26. November 1997 verabschiedet; Umweltdezernat, Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris 1998.
3. Ungarische Verordnung der guten Laborpraxis: 42/2014 (VIII. 19.) EMMI-Erlass des „Minister of Human Capacities“, der dem OECD GLP, ENV/MC/CHEM(98)17 entspricht.
4. Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.G. und Liebsch M. (1998). Die internationale Validierungsstudie von ECVAM zu In-Vitro-Tests auf Hautkorrosivität. II. Ergebnisse und Auswertung durch das Managementteam. *Toxicology in Vitro* 12, 483-524 Pergamon Press/ Elsevier, Oxford, UK
5. Verordnung der Kommission (EG) Nr. 440/2008, Anhang Teil B, B.40Bis: „In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test“, Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L142 vom 31. Mai 2008.
6. *INVITTOX*-Protokoll Nr. 118; „EPISKIN™ Skin Corrosivity Test“, aktualisiert im Dezember 2011 / Februar 2012 (ECVAM-Datenbankdienst zu Alternativmethoden zu Tierversuchen).
7. Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis In Vitro. In: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M und Maibach H.I. (Eds): 133-140.
8. EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (Februar 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals.
9. OECD (2015). OECD-Richtlinie für die Prüfung von Chemikalien. Nr. 404: “Acute Dermal Irritation/Corrosion”, verabschiedet am 28. Juli 2015.
10. STATEMENT ON THE SCIENTIFIC VALIDITY OF THE EPISKIN™ TEST (AN *IN VITRO* TEST FOR SKIN CORROSIVITY); ECVAM JRC Environment Institute, Europäische Kommission; Ispra; 03. April 1998
11. EG (2008), VERORDNUNG (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen sowie die Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG, und Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Amtsblatt der Europäischen Union L353, 1-1355.
12. Vereinte Nationen (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Siebte überarbeitete Auflage, UN New York und Genf, 2017.

ANHÄNGE

ANHANG I

KOPIE DES GLP-ZERTIFIKATS VON Toxi-Coop ZRT.



OGYÉI
Országos Gyógyszerészeti
és Élelmezés-egészségügyi Intézet

1051 Budapest, Zrínyi u. 3.
Levélcíme: 1372 Postafiók 450.
Tel.: (1) 8869-300, Fax: (1) 8869-460
E-mail: ogyei@ogyei.gov.hu, Web: www.ogyei.gov.hu

Ref. no: OGYÉI/8623-5/2019

Admin.: dr. Szaller Zoltán

Date: 22 May, 2019

GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP) CERTIFICATE

It is hereby certified that the test facility

TOXI-COOP Toxicological Research Center Zrt.

**H-1103 Budapest, Cserkesz u. 90.,
H-1045 Budapest, Berliu u. 47-49.,
H-8230 Balatonfüred, Arácsi u. 97-99.,
H-8230 Balatonfüred, Vasút u. 3.,
H-8230 Balatonfüred, Galamb u. 12/A ,
H-8230 Balatonfüred, Ady E. u. 12,
8354 Karmacs, hrsz 4150/2**

is able to carry out

physico-chemical testing, toxicity studies, mutagenicity studies, environmental toxicity studies on aquatic and terrestrial organisms, studies on behaviour in water, soil and air; bio-accumulation studies, analytical and clinical chemistry, safety pharmacology testing, metabolism and toxico/pharmacokinetics testing, testing of toxicological properties of operative procedures and equipment, reproduction toxicological studies, tolerance studies, inhalation toxicology and in vitro studies

in compliance with the Principles of GLP (Good Laboratory Practice) and also complies with the corresponding OECD/European Community requirements.

Date of the inspection: **18-26. February 2019.**

dr.
Mittner
András
Dr. András Mittner
Head of Inspectorate

Digitálisan aláírta:
dr. Mittner András
Dátum: 2019.05.23
09:01:24 +02'00'

ANHANG II

KOPIE DER TESTSYSTEM-QUALITÄTSKONTROLLE



TECHNICAL DATA, SAFETY SHEET AND CERTIFICATE OF ANALYSIS

CCE-091-SM D13-S/04

NAME

EpiSkin™ Small / Human Epidermis (SM/13)

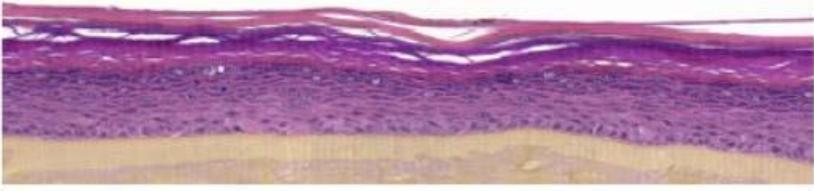
DESCRIPTION

0.38 cm² reconstructed epidermis of normal human keratinocytes. Cells are grown on a collagen matrix, for 13 days

BATCH : 19-EKIN-049
ORIGIN : Adult donors
USAGE : FOR SCIENTIFIC USE ONLY - PRODUCT OF HUMAN ORIGIN
STORAGE : This product was prepared and packaged using aseptic techniques. Store in an incubator at 37°C, 5% CO₂ with saturated humidity

QUALITY CONTROLS

Control # E191892

| | Process | Specification | Result |
|---------------------------|--|--|---------------|
| HISTOLOGY | HES stained paraffin section | Multi-layered, highly differentiated epidermis consisting of organized basal, spinous and granular layers, and a multilayered <i>stratum corneum</i> | Satisfactory |
| | | Number of cell layers ≥ 4 | 9 cell layers |
| HISTOLOGY |  | | |
| IC50 DETERMINATION | SDS concentration, MTT test. | 1.5 mg/mL \leq IC50 \leq 3.0 mg/mL | 2.9 mg/mL |

BIOLOGICAL SAFETY:

On blood of the donors, we have verified the absence of HIV1 and 2 antibodies, hepatitis C antibodies and hepatitis B antigen HBs.
 On cells from the donors, we have verified the absence of bacteria, fungus and mycoplasma.

SUGGESTED EXPIRATION DATE:

December 9, 2019

Lyon, December 3, 2019
 Certified and released by Anais JENSEN, Quality Control Manager 

Manufactured in accordance to the ISO9001 quality system of EpiSkin.
 The use of this human tissue is strictly limited to *in vitro* testing. All other manipulations of this tissue such as: extraction and maintenance of single cells in culture, use of the tissue for diagnostic or therapeutic purposes and in human subjects, are strictly prohibited.

ISO 9001 Certified

4, rue Alexander Fleming - 69366 Lyon Cedex 07 - France - Tél : +33 (0)4 37 28 72 00 - Fax : +33 (0)4 37 28 72 28
 S.A. au capital de 13 608 807 € - 412 127 565 R.C.S. Lyon - NAF : 7211 Z - N° TVA Intracommunautaire FR 46 412 127 565
www.episkin.com

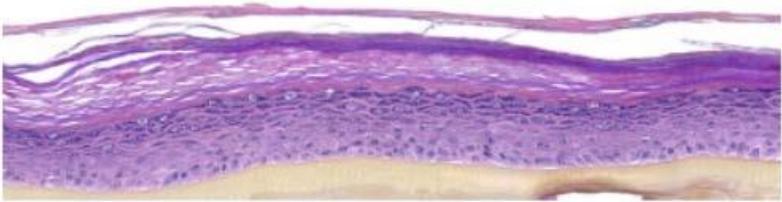



TECHNICAL DATA, SAFETY SHEET AND CERTIFICATE OF ANALYSIS
CCE-091-SM 013-5/04

NAME
EpiSkin™ Small / Human Epidermis (SM/13)

DESCRIPTION
 0.38 cm² reconstructed epidermis of normal human keratinocytes. Cells are grown on a collagen matrix, for 13 days
BATCH : 19-EKIN-040
ORIGIN : Adult donors
USAGE : FOR SCIENTIFIC USE ONLY - PRODUCT OF HUMAN ORIGIN
STORAGE : This product was prepared and packaged using aseptic techniques. Store in an incubator at 37°C, 5% CO₂ with saturated humidity

QUALITY CONTROLS
 Control # E191524

| | Process | Specification | Result |
|---------------------------|--|--|----------------------|
| HISTOLOGY | HES stained paraffin section | Multi-layered, highly differentiated epidermis consisting of organized basal, spinous and granular layers, and a multilayered <i>stratum corneum</i> | Satisfactory |
| | | Number of cell layers ≥ 4 | 8 cell layers |
| HISTOLOGY |  | | |
| IC50 DETERMINATION | SDS concentration, MTT test. | 1.5 mg/mL ≤ IC50 ≤ 3.0 mg/mL | 2.3 mg/mL |

BIOLOGICAL SAFETY:
 On blood of the donors, we have verified the absence of HIV1 and 2 antibodies, hepatitis C antibodies and hepatitis B antigen HBs.
 On cells from the donors, we have verified the absence of bacteria, fungus and mycoplasma.

SUGGESTED EXPIRATION DATE:
 October 7, 2019

Lyon, October 1, 2019
 Certified and released by **Michel BATAILLON**, Quality Control Manager 

Manufactured in accordance to the ISO9001 quality system of EpiSkin.
 The use of this human tissue is strictly limited to *in vitro* testing. All other manipulations of this tissue such as: extraction and maintenance of single cells in culture, use of the tissue for diagnostic or therapeutic purposes and in human subjects, are strictly prohibited.

ISO 9001 Certified
 4, rue Alexander Fleming - 69366 Lyon Cedex 07 - France - Tél : +33 (0)4 37 28 72 00 - Fax : +33 (0)4 37 28 72 28
 S.A. au capital de 13 608 807 € - 412 127 565 R.C.S. Lyon - NAF : 7211 Z - N° TVA Intracommunautaire FR 46 412 127 565
www.episkin.com



ANHANG III

HISTORISCHE KONTROLLDATEN

Tabelle 6: Historische Kontrolldaten

| Historische Kontrolldaten (Zeitraum 2013-2019 Dezember) | | | |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------|
| | Daten Negativkontrolle | Daten Positivkontrolle | |
| | NaCl (9 g/l Kochsalzlösung) | Eisessig | |
| | Optische Dichte (OD) | Optische Dichte (OD) | Funktions-% |
| Mittel | 0,999 | 0,024 | 3 |
| Minimal | 0,571 | 0,002 | 0 |
| Maximal | 1,614 | 0,084 | 10 |