

Abschlussbericht: *In vitro*-

Toxizität von Clair®

Beginn der Testungen: 12.04.2021

Ende der Testungen: 05.05.2021

Universitätsmedizin Greifswald, KdöR

Institut für Hygiene und Umweltmedizin

Labor für Biokompatibilitätsprüfung

und Pathogeninaktivierung

Dr. Paula Zwicker

Ferdinand-Sauerbruch-Str

17475 Greifswald

Zusammenfassung

Testlösung:

Getestet wurde die Lösung Clair® mit folgender Zusammensetzung:

- Clair®: 0,265% Thymol und 1% funktionalisierter Pflanzenextrakt.

Clair® wurde, bezogen auf den Gehalt an Thymol, als höchste Konzentration mit 100 ppm geprüft und in Verdünnungsschritten von jeweils 50% bzw. 20 % bis zur Verdünnung von 0,1 ppm Thymol geprüft. Die Lösungen wurden für die Versuche mit PBS verdünnt. Ein Volumen von 25 % wurde mit Zellkulturmedium (mit 5 % FCS) ersetzt.

Durchgeführte Tests:

Vitalitätstestung der Prüflösungen mittels MTT- und Neutralrottest an einer Lungenepithelzelllinie angelehnt an DIN 10993-5 nach vier Kontaktzeiten (10 min, 30 min, 1 h, 5 h).

Test-Ergebnis (Zusammenfassung):

Die Prüflösung Clair® führte bei keiner Kontaktzeit zu einer Vitalitätsminderung >30 %, unabhängig von der eingesetzten Konzentration.

Anhang:

Protokoll zur Zellkultivierung

Protokoll zur Zytotoxizitätstestung

Einleitung:

Ziel des Zytotoxizitätstests ist die Prüfung zweier Lösungen auf die Induktion zytotoxischer Effekte in Lungenepithelzellen. Bei Kontakt zu zytotoxischen Substanzen wird die Vitalität von Zellen reduziert. Diese Reduktion der Vitalität wird mikroskopisch sichtbar durch Veränderungen der Struktur des Zellverbands und der Zellmorphologie (bspw. Spreitung der Zellen, intrazelluläre Granula). Intrazellulär kommt es außerdem zu Beeinträchtigungen des Metabolismus. Veränderungen der Zellvitalität können beispielsweise über Farbstoffreaktionen ermittelt werden. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird von vitalen Zellen zu einem violetten Formazan reduziert. Nach Elution des Farbstoffs wird die Umsetzung spektralphotometrisch bestimmt. Der Farbstoff Neutralrot wird von allen Zellen aufgenommen. In einem folgenden Waschschritt wird der Farbstoff aus Zellen mit intakter Zellmembran nicht ausgewaschen - nicht vitale Zellen geben den Farbstoff wieder ab. Auch bei diesem Test wird der Farbstoff eluiert und die Aufnahme spektralphotometrisch ermittelt.

Durchführung:

Die Zellen wurden an Tag 1 des Versuchs in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und in DMEM/F12-Medium mit zusätzlich 5 % FCS und 2 mM Glutamin (Zellkulturmedium) für 48 h inkubiert. Am dritten Tag wurden die Zellen mit Hank's Salzlösung (wHBSS, mit Ca^{2+} , Mg^{2+}) gewaschen und mit den Prüflösungen behandelt (Abb. 1). Die Lösung enthielt max. 10 ppm (Air L.O.G. pro[®]) bzw. 100 ppm (Clair[®]) der zu prüfenden Wirkstoffe. Die Prüflösungen wurden in PBS verdünnt. 25 % des Gesamtvolumens wurden vorher durch Zellkulturmedium ersetzt, um die Versorgung der Zellen über die längste Kontaktzeit zu gewährleisten. Gleichzeitig wurde dadurch die Konzentration von fetalem Kälberserum (fetal calf serum; FCS) auf 1,25 % minimiert, um Wechselwirkungen mit den Prüflösungen zu vermeiden sowie die Konzentration an Nährstoffen u.a. für alle Verdünnungen konstant zu halten. Eine Negativkontrolle (NK, Reihe 2) wurde mit Zellkulturmedium (5% FCS) inkubiert, um einen Einfluss durch die Pufferlösung auszuschließen. Als Positivkontrolle (PK) diente SDS (Reihe 10) in Zellkulturmedium. Nach der entsprechenden Kontaktzeit erfolgte die Auswertung, indem die Zellen mit wHBSS gewaschen und mit 100 μl MTT- bzw. Neutralrot-Lösung versetzt wurden. Nach Inkubation über 3 h wurden die Zellen erneut gewaschen und 100 μl (MTT) bzw. 150 μl (NRU) Elutionslösung zugegeben. Nach 30-minütiger Elution erfolgte die Auswertung am Spektralphotometer.

Die inhibitorische Konzentration IC_{30} , also die Konzentration, die zu einer Vitalitätseinbuße von 30 % führt und damit die höchste Konzentration darstellt, die gerade noch keine Zytotoxizität hervorruft, wurde über lineare Regression ermittelt. Die Messwerte von Zellen nach Kontakt mit den Prüflösungen wurden dabei auf die Messwerte der Kontrollzellen mit dem Medium-Puffer-Gemisch bezogen. Werte, die 1,3x größer oder 0,7x kleiner als der Median der jeweiligen Replikate waren,

wurden als Ausreißer ausgeschlossen. Alle Versuche wurden mit je sechs technischen Replikaten durchgeführt.

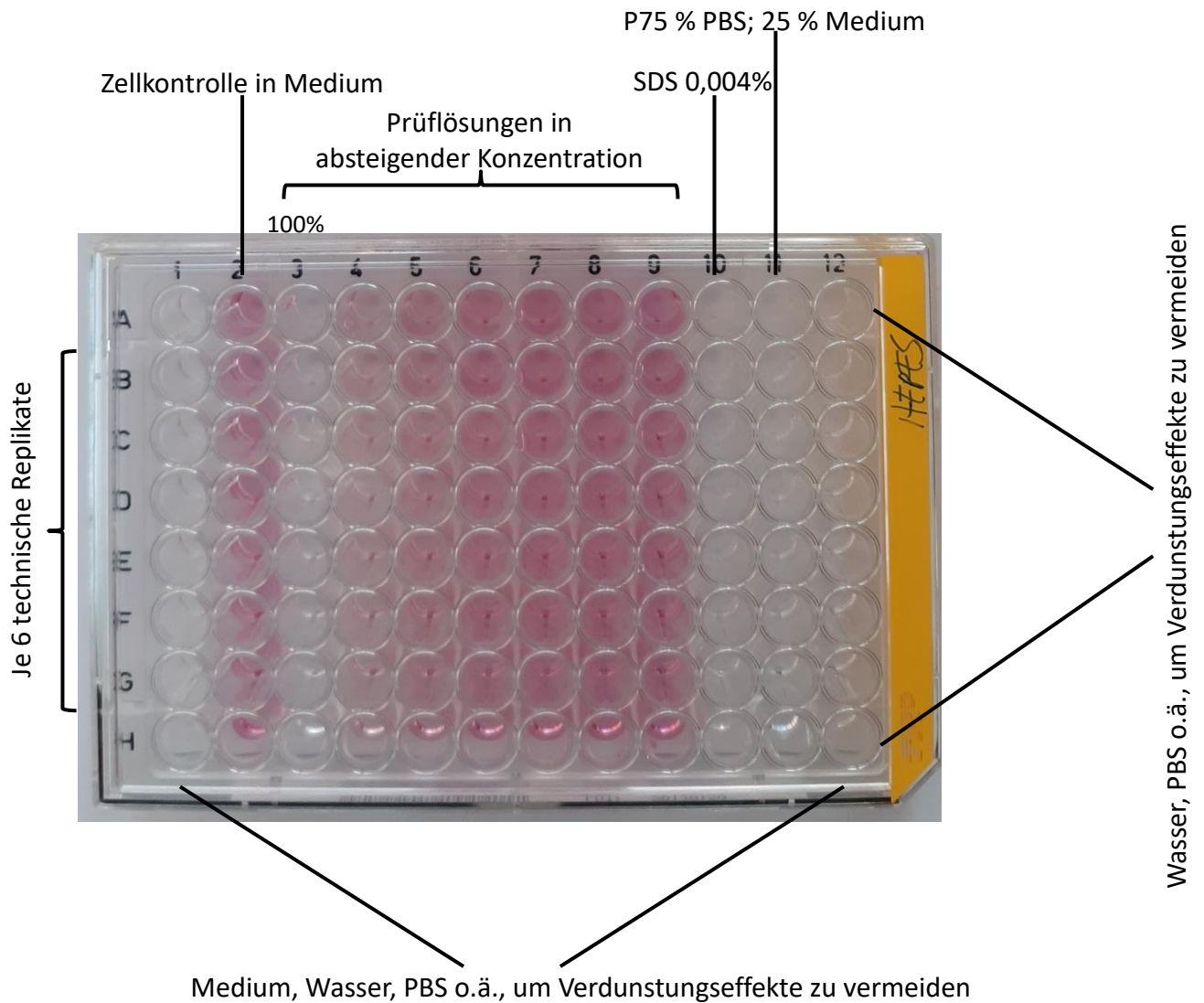


Abbildung 1 Beispielhaftes Layout einer Mikrotiterplatte (MTP) für die Zytotoxizitätstestung einer Prüflösung mit mehreren Konzentrationen. Je Kontaktzeit muss eine separate MTP verwendet werden.

Prüflösungen

Die Stammlösung wurde bei RT und lichtgeschützt gelagert. Jede Gebrauchslösung/Prüflösung wurde vor Beginn der Versuche frisch angesetzt.

Clair®-Stammlösung (SL): 2.650 ppm
VV1: 4,7 µl SL + 245,3 µl wPBS → 50 ppm

Tabelle 1 Pipettierschema zur Herstellung der Prüflösungen für Clair®

Prüflösung	Clair [μL]	wPBS [mL]	Medium [mL]	Konz. [ppm]
PL1	151	ad 3	1	100
PL2	75,5	ad 3	1	50
PL3	37,7	ad 3	1	10
PL4	7,5	ad 3	1	5
PL5	80	ad 3	1	1
PL6	40	ad 3	1	0,5
PL7	8	ad 3	1	0,1

Abkürzungen:

A549	Lungenepithelzelllinie
FCS	fetales Kälberserum
HBSS	Hanks balanced salt solution
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NRU	Neutral-red-uptake
N	Anzahl der Wiederholungen
PBS	Phosphatgepufferte Saline
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Stabdardabweichung
w (in Verbindung mit PBS, HBSS)	Mit Calcium und Magnesium
wo (in Verbindung mit PBS, HBSS)	Ohne Calcium und Magnesium

Test-Ergebnisse und Fehlerbetrachtung:

Die Testung der Prüflösungen im MTT und NRU-Test ergab, dass die höchste Konzentration der Lösung Clair® (100 ppm) keine Zytotoxizität gegenüber der Lungenepithelzelllinie hervorruft (Tab. 2-5).

Tabelle 2 Vitalität der Zellen im MTT- bzw. NRU-Test nach 10 min Behandlung der Zellen mit Clair®. N=2

Clair®		MTT		NRU	
	Behandlung	Zellvitalität [% von Kontrolle]	SD	Zellvitalität [% von Kontrolle]	SD
Bezugswert	Kontrolle (25 % Medium)	100,00	5,21	100,00	5,44
Konzentration der Prüflösung [ppm]	100	95,72	2,85	87,06	3,20
	50	93,11	4,96	96,83	9,11
	10	90,12	3,26	99,03	6,02
	5	91,23	3,55	98,89	5,31
	1	92,08	4,08	99,84	5,07
	0,5	94,33	5,53	97,55	4,70
	0,1	94,05	5,34	97,65	3,70
PK	SDS 0,004%	0,93	1,83	24,02	11,72
NK	Kontrolle (Medium)	109,35	2,92	91,58	1,74

Tabelle 3 Vitalität der Zellen im MTT- bzw. NRU-Test nach 30 min Behandlung der Zellen mit Clair®. N=3

Clair®		MTT		NRU	
	Behandlung	Zellvitalität [% von Kontrolle]	SD	Zellvitalität [% von Kontrolle]	SD
Bezugswert	Kontrolle (25 % Medium)	100,00	3,32	100,00	7,20
Konzentration der Prüflösung [ppm]	100	106,42	12,57	92,93	6,58
	50	99,58	8,79	100,17	8,73
	10	94,30	9,46	98,84	4,79
	5	100,84	10,12	105,00	7,91
	1	97,74	9,21	100,06	2,17
	0,5	101,55	9,60	100,17	4,74
	0,1	101,41	6,36	105,08	10,42
PK	SDS 0,004%	0,00	0,00	4,59	6,32
NK	Kontrolle (Medium)	106,16	7,41	101,67	11,46

Tabelle 4 Vitalität der Zellen im MTT- bzw. NRU-Test nach 60 min Behandlung der Zellen mit Clair®. N=4


Clair®		MTT		NRU	
	Behandlung	Zellvitalität [% von Kontrolle]	SD	Zellvitalität [% von Kontrolle]	SD
Bezugswert	Kontrolle (25 % Medium)	100,00	4,09	100,00	5,03
Konzentration der Prüflösung [ppm]	100	97,83	10,76	85,84	7,78
	50	102,79	14,86	96,34	8,53
	10	94,52	4,27	97,01	7,16
	5	104,29	16,13	101,42	14,17
	1	93,41	6,46	101,55	15,43
	0,5	95,71	5,15	106,60	14,26
	0,1	101,23	10,23	107,06	11,87
PK	SDS 0,004%	3,82	8,00	6,85	6,60
NK	Kontrolle (Medium)	106,78	10,14	89,62	5,79

Tabelle 5 Vitalität der Zellen im MTT- bzw. NRU-Test nach 300 min Behandlung der Zellen mit Clair®. N=3
(MTT), N=4 (NRU)

Clair®		MTT		NRU	
	Behandlung	Zellvitalität [% von Kontrolle]	SD	Zellvitalität [% von Kontrolle]	SD
Bezugswert	Kontrolle (25 % Medium)	100,00	3,14	100,00	8,60
Konzentration der Prüflösung [ppm]	100	74,18	7,50	88,43	16,21
	50	82,05	6,16	103,54	9,71
	10	79,12	5,99	101,55	9,93
	5	85,12	6,58	100,23	8,99
	1	85,57	4,15	96,73	10,19
	0,5	85,97	4,06	98,48	9,16
	0,1	89,89	5,95	101,82	9,11
PK	SDS 0,004%	0,00	0,00	5,90	7,89
NK	Kontrolle (Medium)	99,25	8,70	106,98	9,45
	IC ₃₀	>100 ppm		>100 ppm	
	R ²	-		-	

Schlussfolgerung:

Die höchste eingesetzte Konzentration der Prüflösung Clair® wirkte nach keiner der getesteten Kontaktzeiten zytotoxisch. Deshalb wird Thymol im direkten Zellkontakt mit Lungeneithelzellen bei einer Expositionsdauer von 5 h bis 100 ppm als zellverträglich eingeschätzt.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Paul R.', is located in the lower-left quadrant of the page.

Greifswald, 19.05.2021

Anhang

Protokoll Zellkultivierung

A549, humane Lungenepithelzelllinie

Gewebe: Lunge

Morphologie: Epithel

Eigenschaften: adhärent, Biosafety level 1

Kulturmedium:

DMEM/F12 (PAN Biotech, P04-41450, LOT 4180319), zusätzlich 2 mM L-Glutamin (ccPro, Z-10-M, LOT C389) und 5 % FCS zugeben (gibco, 10270-106, LOT 2166306)

Geräte:

Brutschrank Thermo Scientific Heracell 150i

Sterilwerkbank Thermo Scientific Herasafe KS

Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R

Mikroskop Zeiss Telaval 31

Pipetten Eppendorf Research und Eppendorf Research plus

Auftauen:

In einem 50ml-Stehrandröhrchen werden 5 ml Zellkulturmedium vorgelegt.

Die in Stickstoff gelagerte Kultur wird zügig, möglichst ohne Bewegungen (Scherkräfte!) im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in das vorbereitete Stehrandröhrchen überführt. Die Suspension wird 5 min bei 1200 x g zentrifugiert und der entstehende Überstand dekantiert. Das Pellet wird in 2ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mittels Auszählung in der Neubauer-improved-Zählkammer bestimmt. Die Vitalität wird über Trypan-blau-Färbung überprüft. Die Zellen werden in T75-Zellkulturflaschen in 13 ml Medium ausgesät.

Kultivierung:

Die Zellen werden mikroskopisch auf Wachstum, Morphologie und Unregelmäßigkeiten überprüft. Der Überstand wird entfernt und verworfen und die Zellkultur 2x mit je 5 ml w/oPBS (phosphatgepufferte Saline, ohne Ca²⁺, Mg²⁺) gewaschen. Es werden 3 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/ 0,02 %, PAN Biotech, P10-023100, LOT 8970318) zugegeben und die Zellen bei 37 °C 5min inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 9 ml Medium aufgenommen und gründlich resuspendiert. Die Suspension wird in ein Stehrandröhrchen überführt und 3 min bei 1200 x g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahl vitaler Zellen wird über Auszählung in einer Neubauer-improved-Zählkammer mittels Trypan-blau-Färbung bestimmt. Es werden 0,4-0,5 x 10⁶ Zellen pro T75-Flaschen in 13 ml Medium ausgesät.

Einfrieren:

Zur Kryokonservierung werden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen. Dazu wird komplettem Zellkulturmedium zusätzlich 5 % DMSO und weitere 5 % FCS zugegeben.

Protokoll Zytotoxizitätstest

Geräte:

Brutschrank Thermo Scientific Heracell 150i
Sterilwerkbank Thermo Scientific Herasafe KS
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R
Mikroskop Zeiss Telaval 31
Pipetten Eppendorf Research und Eppendorf Research plus
Schüttler Heidolph Titramax 1000
Spektralphotometer BIO-TEK PowerWave XS
Waage Sartorius BP 210 D (D-K-19406-01-00)

Lösungen:

- Medium=DMEM/F12, 5 % FCS
- Positivkontrolle SDS
 - 24h: 0,004% in PBS/Medium
- Neutralrot-Lösung: 600 µl der Stammlösung (0,33 %, Fluka) mit 33 ml Medium verdünnen. Die Lösung 24 h vor Benutzung ansetzen, im Brutschrank inkubieren (leicht geöffneter Deckel) und anschließend steril filtrieren.
- MTT-Medium: 3 ml der Stammlösung (5 mg/ml, Sigma Aldrich) mit 27 ml Medium verdünnen
- Formazan-Elutionslösung (für MTT-Test): Für die Herstellung von 100 ml Elutionslösung werden 96 ml 2-Propanol und 4 ml 1 M HCl gründlich gemischt. Die resultierende Lösung wird bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und sollte innerhalb von 3 Monaten verbraucht werden.
- EtOH/HAc-Elutionslösung (für NRU-Test): Kurz vor Verwendung werden 1 Vol.- Anteil Eisessig (HAc), 50 Vol.-Anteile Ethanol (EtOH) und 49 Vol.-Anteile Aqua gemischt.

Prüfzeit:

10 min, 30 min, 60 min, 300 min

Nachweisverfahren:

MTT-Test und NRU-Test

Durchführung:

Tag 1:

Zellen wie gewohnt trypsinieren und für weitere Kultur entsprechend aussäen. Die restlichen Zellen in Medium aufnehmen und die Zellsuspension auf eine Dichte von $0,1 \times 10^6$ Zellen/ml einstellen. Es werden je 100 µl der Zellsuspension in die dafür vorgesehenen Wells (Z) einer 96well MTP ausgesät und diese 48 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, Luftfeuchtigkeit 95 %) inkubiert. In die äußeren Wells wird reines Medium ohne Zellen pipettiert.

Pipettierschema Zellen/Medium Tag 1:

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
B	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M
C	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M
D	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M
E	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M
F	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M
G	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M
H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

Tag 3:

Pro Reihe und MTP werden 1000 µl der Prüflösung (Verdünnung) benötigt. Es werden in einem Mehrkanalreservoir das entsprechende Volumen der Prüflösung mit PBS auf 750 µl aufgefüllt und 250 µl Medium zugegeben. Die Ausgangskonzentration der Prüflösung Clair® lag bei bei 2650 ppm.

Das Medium der MTP wird durch abkippen im Waschbecken entfernt und die Platte 1x mit 100 µl HBSS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) je Well gewaschen.

Die Lösungen werden wie folgt pipettiert:

Reihe A und H: Medium

Spalte 1: Medium


Spalte 2-9: Prüflösungen in absteigender Konzentration

Spalte 10: SDS

Spalte 11: PBS mit 25 % Medium

Pipettierschema Tag 3, Beispiel einer Prüflösung mit 10 ppm

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
B	M	Medium	Prüflösung 10 ppm	Prüflösung 5 ppm	Prüflösung 2,5 ppm	Prüflösung 1,25 ppm	Prüflösung 0,625 ppm	Prüflösung 0,3125 ppm	Prüflösung 0,15625 ppm	SDS 0,004 %	75 % PBS, 25 % Medium	M
C	M											M
D	M											M
E	M											M
F	M											M
G	M											M
H	M											M


Verdünnung 1:2 (100µl+100µl)

Anschließend wird die MTP über die entsprechende Kontaktzeit im Brutschrak inkubiert. Danach wird das Medium/die Prüflösungen abgekippt und die Zellen wieder mit 100 µl HBSS/Well gewaschen. Es werden je 100 µl der Nachweislösungen (MTT, NR) zugegeben und erneut 3 h inkubiert. Nach der Inkubation werden die Färbelösungen abgekippt und die MTP für den NR-Test gewaschen.

Für die Elution werden entweder 100 µl MTT-Elutionslösung oder 150 µl NR-Elutionslösung zugegeben und die MTP 30 min unter schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran erfolgt die Messung der Absorption bei 570/650 nm (MTT) bzw. 540/650 nm gemessen. Für die Auswertung wird die Absorption der Zellen nach Behandlung mit der Prüflösung auf die Absorption der Kontrollzellen (Puffer, 25 % Medium) bezogen. Werte, die mehr als >1,3x dem Median oder <0,7x Median sind, werden als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen.