

	DIN EN ISO 10993-5	DIN
ICS 11.100.20	Ersatz für DIN EN ISO 10993-5:1999-11	
<p><b>Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009); Deutsche Fassung EN ISO 10993-5:2009</b></p> <p>Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009); German version EN ISO 10993-5:2009</p> <p>Évaluation biologique des dispositifs médicaux – Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro (ISO 10993-5:2009); Version allemande EN ISO 10993-5:2009</p>		
Gesamtumfang 46 Seiten		
Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO) im DIN		



**DIN EN ISO 10993-5:2009-10****Nationales Vorwort**

Dieses Dokument (EN ISO 10993-5:2009) wurde vom ISO/TC 194 „Biological evaluation of medical devices“ in Zusammenarbeit mit dem CEN/TC 206 „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 027-02-12 AA „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ im Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO).

ISO 10993 besteht unter dem allgemeinen Titel „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ aus folgenden Teilen:

- *Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems*
- *Teil 2: Tierschutzbestimmungen*
- *Teil 3: Prüfungen auf Genotoxizität, Karzinogenität und Reproduktionstoxizität*
- *Teil 4: Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut*
- *Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität*
- *Teil 6: Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantation*
- *Teil 7: Ethylenoxid-Sterilisationsrückstände*
- *Teil 9: Rahmen zur Identifizierung und Quantifizierung von möglichen Abbauprodukten*
- *Teil 10: Prüfungen auf Irritation und Allergien vom verzögerten Typ*
- *Teil 11: Prüfungen auf systemische Toxizität*
- *Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien*
- *Teil 13: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Abbauprodukten in Medizinprodukten aus Polymeren*
- *Teil 14: Qualitativer und quantitativer Nachweis von keramischen Abbauprodukten*
- *Teil 15: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Abbauprodukten aus Metallen und Legierungen*
- *Teil 16: Entwurf und Auslegung toxikokinetischer Untersuchungen hinsichtlich Abbauprodukten und Extrakten*
- *Teil 17: Nachweis zulässiger Grenzwerte für herauslösbare Bestandteile*
- *Teil 18: Chemische Charakterisierung von Werkstoffen*
- *Teil 19: Physikalisch/chemische, mechanische und morphologische Charakterisierung [Technische Spezifikation]*
- *Teil 20: Prinzipien und Verfahren für die Immuntoxikologische Prüfung von Medizinprodukten [Technische Spezifikation]*

Für die im Abschnitt 2 zitierten Internationalen und Europäischen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 10993-1	siehe	DIN EN ISO 10993-1
ISO 10993-12	siehe	DIN EN ISO 10993-12

## **Änderungen**

Gegenüber DIN EN ISO 10993-5:1999-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Norm redaktionell überarbeitet;
- b) Aufnahme von Kontrollproben in Abschnitt 4;
- c) Anpassung der Extraktionszeiten in 4.2.3.2;
- d) Aufnahme von Tabelle 1 und 2 in Abschnitt 8.5 zur qualitativen Bewertung der Zytotoxizität;
- e) Aufnahme des Anhang A „Zytotoxizitätsprüfung durch Aufnahme von Neutralrot“;
- f) Aufnahme des Anhang B „Zytotoxizitätsprüfung mittels Zellkoloniebildung“;
- g) Aufnahme des Anhang C „Zytotoxizitätsprüfung mit MTT“;
- h) Aufnahme des Anhang D „Zytotoxizitätsprüfung mit XTT“;
- i) Aufnahme des Anhang ZA „Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 93/42/EWG“;
- j) Aufnahme des Anhang ZB „Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 90/385/EWG“.

## **Frühere Ausgaben**

DIN EN 30993-5: 1994-08

DIN EN ISO 10993-5: 1999-11

## **DIN EN ISO 10993-5:2009-10**

### **Nationaler Anhang NA** (informativ)

#### **Literaturhinweise**

DIN EN ISO 10993-1, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems*

DIN EN ISO 10993-12, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien*

EUROPÄISCHE NORM  
EUROPEAN STANDARD  
NORME EUROPÉENNE

EN ISO 10993-5

Juni 2009

ICS 11.100.20

Ersatz für EN ISO 10993-5:1999

Deutsche Fassung

Biologische Beurteilung von Medizinprodukten —  
Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität  
(ISO 10993-5:2009)

Biological evaluation of medical devices —  
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity  
(ISO 10993-5:2009)

Évaluation biologique des dispositifs médicaux —  
Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro  
(ISO 10993-5:2009)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 17. April 2009 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort .....	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich .....	6
2 Normative Verweisungen.....	6
3 Begriffe .....	6
4 Vorbereitung von Proben und Kontrollen .....	7
4.1 Allgemeines .....	7
4.2 Herstellung flüssiger Extrakte des Materials .....	7
4.2.1 Grundsätze der Extraktion .....	7
4.2.2 Extraktionsmedium.....	8
4.2.3 Extraktionsbedingungen.....	8
4.3 Materialvorbereitung für Prüfungen mit direktem Kontakt .....	9
4.3.1 Form der Prüfmuster .....	9
4.3.2 Sterilität von Prüfmustern.....	9
4.3.3 Flüssige Prüfmuster .....	9
4.3.4 Absorbierende Prüfmuster .....	10
4.4 Vorbereitung von Kontrollen .....	10
5 Zelllinien .....	10
6 Kulturmedium.....	10
7 Vorbereitung der Zellstammkultur .....	11
8 Prüfverfahren .....	11
8.1 Anzahl der Parallelproben .....	11
8.2 Prüfung an Extrakten .....	11
8.3 Prüfung durch direkten Kontakt.....	12
8.4 Prüfung durch indirekten Kontakt .....	13
8.4.1 Agardiffusion.....	13
8.4.2 Filterdiffusion .....	14
8.5 Bestimmung der Zytotoxizität .....	14
9 Prüfbericht.....	16
10 Beurteilung der Ergebnisse .....	16
Anhang A (informativ) Zytotoxizitätsprüfung durch Aufnahme von Neutralrot .....	18
A.1 Allgemeines .....	18
A.2 Versuchsdurchführung .....	18
A.2.1 Grundlegendes Verfahren.....	18
A.2.2 Material .....	18
A.2.3 Verfahren .....	21
A.2.4 Datenanalyse.....	24
Anhang B (informativ) Zytotoxizitätsprüfung mittels Zellkoloniebildung .....	25
B.1 Allgemeines .....	25
B.2 Versuchsdurchführung .....	25
B.2.1 Grundlegendes Verfahren.....	25
B.2.2 Material .....	25
B.2.3 Verfahren .....	27
B.2.4 Prüfbericht.....	29

**Anhang C (informativ) Zytotoxizitätsprüfung mit MTT ..... 30**

**C.1 Allgemeines ..... 30**

**C.2 Versuchsdurchführung..... 30**

**C.2.1 Grundlegendes Verfahren ..... 30**

**C.2.2 Material ..... 30**

**C.2.3 Verfahren ..... 32**

**C.2.4 Datenaufzeichnung ..... 34**

**C.2.5 Datenanalyse ..... 34**

**Anhang D (informativ) Zytotoxizitätsprüfung mit XTT ..... 35**

**D.1 Allgemeines ..... 35**

**D.2 Versuchsdurchführung..... 35**

**D.2.1 Grundlegendes Verfahren ..... 35**

**D.2.2 Material ..... 35**

**D.2.3 Verfahren ..... 37**

**D.2.4 Datenaufzeichnung ..... 39**

**D.2.5 Datenanalyse ..... 39**

**Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 93/42/EWG ..... 40**

**Anhang ZB (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 90/385/EWG ..... 41**

**Literaturhinweise ..... 42**

# **DIN EN ISO 10993-5:2009-10** **EN ISO 10993-5:2009 (D)**

## **Vorwort**

Dieses Dokument (EN ISO 10993-5:2009) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 194 „Biological evaluation of medical devices“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 206 „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2009 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder] CENELEC sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 10993-5:1999.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EG-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EG-Richtlinien siehe informative Anhänge ZA und ZB, die Bestandteile dieses Dokuments sind.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

## **Anerkennungsnotiz**

Der Text von ISO 10993-5:2009 wurde vom CEN als EN ISO 10993-5:2009 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.



## Einleitung

Wegen der generellen Anwendbarkeit von *In-vitro*-Zytotoxizitätsprüfungen und deren weitverbreiteter Anwendung zur Beurteilung eines großen Spektrums von Medizinprodukten und Materialien dient dieser Teil der ISO 10993 eher der Festlegung eines Prüfschemas, das schrittweise Entscheidungen erfordert, als der Festlegung eines einzelnen Prüfverfahrens. Das Prüfschema sollte zur Auswahl des am besten geeigneten Prüfverfahrens führen.

Drei Kategorien von Prüfverfahren werden aufgeführt: Prüfung von Extrakten, Prüfung mit direktem Kontakt und Prüfung ohne direktem Kontakt zwischen Zellen und Material.

Die Auswahl einer oder mehrerer dieser Kategorien hängt von der Art der zu beurteilenden Probe, der möglichen Applikationsstelle und der Art der Anwendung ab.

Diese Auswahl bestimmt dann die Einzelheiten der Vorbereitung der zu prüfenden Proben, die Vorbereitung der Kulturzellen und die Art, wie die Zellen den Proben oder deren Extrakten ausgesetzt werden.

Am Ende der Expositionszeit erfolgt eine Beurteilung hinsichtlich des Vorliegens und Grades der zytotoxischen Wirkung. Die Wahl der Art der Beurteilung wird in diesem Teil der ISO 10993 absichtlich offen gelassen. Ein derartiges Vorgehen führt zur Bereitstellung einer Testreihe, was die Herangehensweise vieler Gruppen widerspiegelt, die biologische In-vitro-Prüfungen befürworten.

Die Vielzahl der zur Bestimmung der Zytotoxizität angewendeten Verfahren und gemessenen Endpunkte kann hinsichtlich der Beurteilung in folgende Kategorien eingeteilt werden:

- Beurteilung der Zellschädigung aufgrund morphologischer Veränderungen;
- Messungen der Zellschädigung;
- Messungen des Zellwachstums;
- Messungen spezifischer Aspekte des Zellstoffwechsels.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, in jeder dieser vier Kategorien Ergebnisse zu erzielen. Der Prüfer sollte auf die Prüfkategorien und darauf achten, zu welcher Kategorie ein spezielles Prüfverfahren gehört, damit die Ergebnisse für ähnliche Produkte oder Materialien sowohl innerhalb eines Laboratoriums als auch zwischen Laboratorien verglichen werden können. Beispiele von Vorschriften für quantitative Prüfungen sind in den Anhängen angeführt. Ein Leitfaden zur Auswertung der Ergebnisse wird in diesem Teil der ISO 10993 gegeben.

# DIN EN ISO 10993-5:2009-10

## EN ISO 10993-5:2009 (D)

### 1 Anwendungsbereich

Dieser Teil der ISO 10993 beschreibt Prüfverfahren zur Beurteilung der In-vitro-Zytotoxizität von Medizinprodukten.

Diese Verfahren legen die Kultivierung von Zellen fest, entweder in direktem Kontakt mit einem Medizinprodukt und/oder Extrakten eines Medizinprodukts oder durch Diffusion.

Diese Verfahren sind dafür ausgelegt, die biologische Reaktion von Säugetierzellen *in-vitro* unter Anwendung geeigneter biologischer Parameter zu bestimmen.

### 2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 10993-1, *Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management system*

ISO 10993-12, *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*

### 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 10993-1 und die folgenden Begriffe.

#### 3.1

##### Kulturgefäße

für Zellkulturen geeignete Gefäße, einschließlich Petrischalen aus Glas, Kulturflaschen aus Kunststoff oder Multiwell- und Mikrotiterplatten aus Kunststoff

**ANMERKUNG** Diese Kulturgefäße sind hinsichtlich ihrer Verwendung in diesen Verfahren wechselseitig austauschbar, vorausgesetzt, sie erfüllen die Anforderungen an die Gewebekulturqualität und sind für die Verwendung mit Säugetierzellen geeignet.

#### 3.2

##### positives Kontrollmaterial

Material, das bei der Prüfung nach diesem Teil der ISO 10993 eine reproduzierbare zytotoxische Reaktion hervorruft

**ANMERKUNG** Der Zweck der Positivkontrolle ist es, eine angemessene Reaktion des Prüfsystems anzuzeigen. Zum Beispiel wurde ein mit organischem Zinn stabilisiertes Polyurethan<sup>1)</sup> als Positivkontrolle für feste Materialien und Extrakte verwendet. Verdünnungen von Phenol werden zum Beispiel als Positivkontrolle für Extrakte verwendet. Zusätzlich zu einem Material können auch reine Chemikalien zum Nachweis der Leistung des Prüfsystems verwendet werden.

#### 3.3

##### Blindprobe

Extraktionsmedium ohne Prüfmuster, das in einem Gefäß aufbewahrt wird, das mit dem Gefäß identisch ist, in dem sich das Prüfmuster befindet, und das den gleichen Bedingungen ausgesetzt ist wie das Prüfmuster während der Extraktion

---

1) Die Polyurethane ZDEC und ZDBC können vom Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute, (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japan) bezogen werden.

**ANMERKUNG** Die Blindprobe dient der Bewertung möglicher verfälschender Effekte durch das Extraktionsgefäß, das Extraktionsmedium und den Extraktionsprozess.

### 3.4

#### **negatives Kontrollmaterial**

Material, das bei der Prüfung nach der vorliegenden Internationalen Norm keine zytotoxische Reaktion hervorruft

**ANMERKUNG** Der Zweck der Negativkontrolle ist es, eine Hintergrundreaktion der Zellen anzuzeigen. Zum Beispiel wurden als Negativkontrollen Polyethylen hoher Dichte<sup>2)</sup> für synthetische Polymere und Stäbe aus keramischem Aluminiumoxid für Dentalwerkstoffe verwendet.

### 3.5

#### **Prüfmuster**

Material, Produkt, Anteil oder Bestandteil eines Produkts, Extrakt oder Anteil davon, das/der der biologischen oder chemischen Prüfung oder Beurteilung unterzogen wird

### 3.6

#### **Subkonfluenz**

etwa 80 % Konfluenz, d. h. das Ende der logarithmischen Phase der Wachstumskurve

## 4 Vorbereitung von Proben und Kontrollen

### 4.1 Allgemeines

Die Prüfung ist entweder

a) an einem Extrakt des Prüfmusters

und/oder

b) dem Prüfmuster selbst

vorzunehmen.

Die Probenvorbereitung muss in Übereinstimmung mit ISO 10993-12 erfolgen.

In jeden Versuch sind Negativ- und Positivkontrollen einzubeziehen.

### 4.2 Herstellung flüssiger Extrakte des Materials

#### 4.2.1 Grundsätze der Extraktion

Die Extraktionsbedingungen sollten die Bedingungen der klinischen Anwendung möglichst simulieren oder übertreffen, damit das toxikologische Gefährdungspotenzial ermittelt werden kann, ohne dass wesentliche Veränderungen des Prüfmusters, wie z. B. Fusion, Schmelzen oder irgendeine Veränderungen der chemischen Struktur, hervorgerufen werden, es sei denn, das wird bei der klinischen Anwendung erwartet. Aufgrund der Beschaffenheit bestimmter Materialien (z. B. biologisch abbaubare Materialien) können während des Extraktionsverfahrens Veränderungen der chemischen Struktur auftreten.

---

2) Polyethylen hoher Dichte können von U.S. Pharmacopeia (Rockville — Maryland — USA) und Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257 — Japan) bezogen werden.

Die Angaben in 1) und 2) dienen nur zur Unterrichtung der Anwender über diesen Teil der ISO10993 und bedeuten keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen benutzt werden, wenn aufgezeigt werden kann, dass diese zum selben Ergebnis führen.

# DIN EN ISO 10993-5:2009-10

## EN ISO 10993-5:2009 (D)

**ANMERKUNG** Die Konzentration von endogenen Substanzen oder Fremdstoffen im Extrakt und damit die Menge, der die zu prüfenden Zellen ausgesetzt sind, hängt von der Kontaktfläche, dem Extraktionsvolumen, dem pH-Wert, der chemischen Löslichkeit, der Diffusionsrate, der Osmolarität, der Flüssigkeitsbewegung, der Temperatur, der Zeitdauer und anderen Faktoren ab.

Bei Produkten, die das Mischen von zwei oder mehr Bestandteilen im Patienten zum Erhalt des Endprodukts (z. B. Knochenzement) einschließen, sollte das Endprodukt vor der Extraktion nicht gewaschen werden. Das Waschen des Prüfmusters kann auf dem Produkt vorhandene Rückstände verringern oder entfernen. Wenn das Prüfmuster in steriler Umgebung eingesetzt wird, sollte für die Extraktion chemischer Bestandteile ein sterilisiertes Prüfmuster verwendet werden.

### 4.2.2 Extraktionsmedium

Die Wahl des (der) Extraktionsmediums (Extraktionsmedien) ist unter Berücksichtigung der chemischen Eigenschaften des Materials zu begründen und zu dokumentieren. Bei Versuchen mit Säugetierzellen sind ein oder mehrere der folgenden Extraktionsmedien einzusetzen:

- a) Kulturmedium mit Serum;
- b) physiologische Salzlösung;
- c) andere geeignete Medien.

Die Wahl des Extraktionsmediums sollte vom Ziel der Extraktion bestimmt werden. Es ist die Verwendung sowohl einer polaren als auch einer nichtpolaren Trägersubstanz in Betracht zu ziehen. Das bevorzugte Extraktionsmedium ist Kulturmedium mit Serum. Die Verwendung von Kulturmedium mit Serum wird für die Extraktion bevorzugt, weil dieses Medium in der Lage ist, sowohl das Zellwachstum zu fördern als auch polare und nichtpolare Substanzen zu extrahieren. Zusätzlich zum Kulturmedium mit Serum sollte die Verwendung von Medium ohne Serum in Betracht gezogen werden, um speziell polare Substanzen (z. B. Ionenverbindungen) zu extrahieren. Weitere geeignete Extraktionsmedien sind gereinigtes Wasser und Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO ist in ausgewählten Prüfsystemen bei Konzentrationen von mehr als 0,5 % (Volumenanteil) zytotoxisch. Die zelluläre Expositionskonzentration extrahierbarer Substanzen in DMSO ist im Vergleich zur Extraktion im Kulturmedium mit Serum aufgrund der stärkeren Verdünnung geringer.

**ANMERKUNG 1** Es können verschiedene Arten von Serum (z. B. fetales, Rinder-/Kälber-Serum, Serum neugeborener Kälber) verwendet werden; die Wahl des Serums hängt vom Zelltyp ab.

**ANMERKUNG 2** Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass Serum/Proteine bekanntermaßen einen bestimmten Anteil der extrahierbaren Substanzen binden.

### 4.2.3 Extraktionsbedingungen

**4.2.3.1** Die Extraktion muss in sterilen, chemisch inerten, geschlossenen Behältern unter Anwendung aseptischer Techniken, in Übereinstimmung mit ISO 10993-12, erfolgen.

**4.2.3.2** Mit Ausnahme der nachstehend angeführten Fälle ist die Extraktion unter einer der folgenden Bedingungen durchzuführen, die entsprechend den Produkteigenschaften und speziellen Einsatzbedingungen anzuwenden sind:

- a)  $(24 \pm 2)$  h bei  $(37 \pm 1)$  °C;
- b)  $(72 \pm 2)$  h bei  $(50 \pm 2)$  °C;
- c)  $(24 \pm 2)$  h bei  $(70 \pm 2)$  °C;
- d)  $(1 \pm 0,2)$  h bei  $(121 \pm 2)$  °C.

Die vorstehend beschriebenen Extraktionsbedingungen, die verwendet wurden, um ein Maß für das Gefährdungspotenzial zur Risikobewertung des Produktes oder Materials zu liefern, beruhen auf einem früheren

Präzedenzfall. Es dürfen andere Bedingungen, z. B. längere oder kürzere Extraktionszeiten bei 37 °C, angewendet werden, die die während der klinischen Anwendung auftretende Extraktion simulieren oder ein angemessenes Maß für das Gefährdungspotenzial liefern; diese sind jedoch zu begründen und zu dokumentieren. Bei Medizinprodukten, die sich in kurzzeitigem Kontakt (nicht länger als 4 h kumulierter Kontaktdauer) mit intakter Haut oder Schleimhaut befinden und nicht implantiert werden kann das Extraktionszeiten von weniger als 24 h, jedoch nicht weniger als 4 h, wie in a) bis c) angeführt, einschließen.

Ein Zellkulturmedium mit Serum sollte nur nach a) verwendet werden, weil Extraktionstemperaturen von mehr als  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  die chemischen Eigenschaften und/oder Stabilität des Serums und weiterer Bestandteile im Kulturmedium negativ beeinflussen können.

Bei polymeren Prüfmustern sollte die Extraktionstemperatur die Glasübergangstemperatur nicht überschreiten, da eine höhere Temperatur die Zusammensetzung des Extraktionsmittels verändern kann.

**4.2.3.3** Wenn der Extrakt vor der Einwirkung auf die Zellen filtriert, zentrifugiert oder auf andere Weise behandelt wird, müssen diese Einzelheiten zusammen mit einer Begründung für die zusätzlichen Schritte im Abschlussbericht (siehe Abschnitt 9) angegeben werden. Sämtliche Einstellungen des pH-Wertes des Extrakts müssen im Prüfbericht angegeben werden. Beeinflussungen des Extrakts, wie z. B. durch Einstellung des pH-Wertes, sollten vermieden werden, da sie das Ergebnis beeinflussen können.

### 4.3 Materialvorbereitung für Prüfungen mit direktem Kontakt

#### 4.3.1 Form der Prüfmuster

Materialien, die verschiedene Formen, Größen oder physikalische Zustände (z. B. flüssig, gelförmig, fest usw.) haben, dürfen ohne Modifikation in den Zytotoxizitätsversuchen geprüft werden.

Das bevorzugte Prüfmuster eines festen Materials sollte mindestens eine ebene Oberfläche aufweisen. Wenn das nicht der Fall ist, müssen Anpassungen erfolgen, um ebene Oberflächen zu erreichen.

#### 4.3.2 Sterilität von Prüfmustern

**4.3.2.1** Die Sterilität der Prüfmuster muss berücksichtigt werden.

**4.3.2.2** Prüfmuster von sterilisierten Produkten sind während des gesamten Prüfverfahrens aseptisch zu handhaben.

**4.3.2.3** Die Prüfmuster von Produkten, die üblicherweise nicht steril geliefert, aber vor der Anwendung sterilisiert werden, sind nach dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren zu sterilisieren und während des gesamten Prüfverfahrens aseptisch zu behandeln.

Die Auswirkung der Sterilisationsverfahren oder -mitteln auf das Produkt sollte bei der Festlegung der Vorbereitung des Prüfmusters vor der Anwendung im Prüfsystem berücksichtigt werden.

**4.3.2.4** Die Prüfmuster von Produkten, die zur Anwendung nicht steril sein müssen, sind wie geliefert zu verwenden und sind während des gesamten Prüfverfahrens aseptisch zu handhaben. Es kann gerechtfertigt sein, das Prüfmaterial zu sterilisieren, um eine mikrobielle Kontamination der Zellkultur zu verhindern; jedoch darf der Sterilisationsprozess die Eigenschaften des Prüfmaterials nicht verändern.

Wenn nicht sterile Prüfmuster verwendet werden, sollten sie auf bakterielle Kontamination geprüft werden, weil eine Kontamination zu einer falschen Bewertung der Zytotoxizität führen kann.

#### 4.3.3 Flüssige Prüfmuster

Flüssige Prüfmuster sind entweder durch

a) direkte Zugabe;

# DIN EN ISO 10993-5:2009-10

## EN ISO 10993-5:2009 (D)

oder

b) nach Applikation auf einen biologisch inerten saugfähigen Träger zu prüfen.

Filterscheiben haben sich für die Verwendung als inerte saugfähige Träger als geeignet erwiesen.

### 4.3.4 Absorbierende Prüfmuster

Sofern zutreffend, müssen absorbierende Materialien vor der Prüfung mit dem Kulturmedium getränkt werden, um eine Adsorption des Kulturmediums aus dem Prüfgefäß zu verhindern.

## 4.4 Vorbereitung von Kontrollen

Kontrollen sollten so ausgewählt werden, dass diese mit demselben Verfahren wie das Prüfmuster vorbereitet werden können.

## 5 Zelllinien

Etablierte Zelllinien sind vorzuziehen und sind, wenn sie verwendet werden, von anerkannten Bezugsquellen<sup>3)</sup> zu beziehen.

Falls eine spezifische Empfindlichkeit gefordert wird, dürfen primäre Zellkulturen, Zelllinien und organotypische Kulturen, die direkt aus lebendem Gewebe entnommen wurden, nur dann verwendet werden, wenn die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Reaktion nachgewiesen werden können.

Wenn eine Stammkultur einer Zelllinie aufbewahrt wird, muss die Aufbewahrung bei –80 °C oder darunter im entsprechenden Kulturmedium, das jedoch ein Kälteschutzmittel, z. B. Dimethylsulfoxid oder Glycerin, enthält, erfolgen. Eine Langzeitaufbewahrung (mehrere Monate bis viele Jahre) ist nur bei –130 °C oder darunter möglich.

Es dürfen nur Zellen, die frei von Mycoplasmen sind, für die Prüfung verwendet werden. Vor der Anwendung sollten die Stammkulturen auf das Nichtvorhandensein von Mycoplasmen überprüft werden.

Es ist wichtig, die Zellen regelmäßig zu überprüfen (z. B. Morphologie, Verdopplungszeit, modale Chromosomenzahl), da sich die Empfindlichkeit in den Prüfungen mit der Passagezahl ändern kann.

Die Gute Zellkulturpraxis sollte angewendet werden. Siehe Literaturhinweis [5].

## 6 Kulturmedium

Das Kulturmedium muss steril sein.

Das Kulturmedium mit oder ohne Serum muss den Wachstumsanforderungen der gewählten Zelllinie entsprechen.

Antibiotika dürfen dem Medium beigegeben werden, vorausgesetzt, dass sie die Versuche nicht nachteilig beeinflussen.

---

3) Zum Beispiel werden die Zelllinien American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC Klon 929), CCL 163 (Balb/3T3 Klon A31), CCL 171 (MRC-5) und CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) und CCL 10 [(BHK-21(C-13))] und V-79 379A von Experten der ISO als geeignet angesehen.

Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender von diesem Teil der ISO10993 und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Andere Zelllinien dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen oder aussagekräftigeren Ergebnissen führen.

Die Aufbewahrungsbedingungen müssen validiert sein.

**ANMERKUNG** Die Stabilität des Kulturmediums ändert sich mit der Zusammensetzung und den Aufbewahrungsbedingungen.

Das Kulturmedium ist auf einem pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 zu halten.

## 7 Vorbereitung der Zellstammkultur

Unter Verwendung der gewählten Zelllinie und des gewählten Kulturmediums sind genügend Zellen vorzubereiten, um die Prüfung vollständig durchzuführen. Wenn die Zellen aus vom Vorrat genommenen Kulturen zu vermehren sind, ist das Kälteschutzmittel, falls vorhanden, zu entfernen. Vor der Verwendung ist von den Zellen mindestens einmal eine Subkultur anzulegen.

Bei der Subkultivierung von Zellen sind die Zellen nach einem für die Zelllinie geeigneten Verfahren durch enzymatische und/oder mechanische Disaggregation abzulösen und wieder zu suspendieren.

## 8 Prüfverfahren

### 8.1 Anzahl der Parallelproben

Für die Prüfmuster und Kontrollen sind mindestens drei Parallelproben zu verwenden.

### 8.2 Prüfung an Extrakten

**8.2.1** Diese Prüfung erlaubt sowohl eine qualitative als auch quantitative Beurteilung der Zytotoxizität.

**8.2.2** Ein Aliquot einer ständig umgerührten Zellsuspension ist zur Exposition gegenüber den Extrakten in jedes der in ausreichender Anzahl vorhandenen Kulturgefäße zu pipettieren. Die Zellen sind durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig über die Fläche jedes Kulturgefäßes zu verteilen.

**8.2.3** Die Kulturen sind bei  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  an Luft mit oder ohne Kohlendioxid, je nach Eignung für das Puffersystem, das für das Kulturmedium gewählt wurde, zu bebrüten.

Die Prüfung sollte an einem subkonfluenten einschichtigen Zellrasen oder an frisch suspendierten Zellen vorgenommen werden.

Bei der Prüfung mittels Koloniebildung muss eine geeignete niedrige Zelldichte verwendet werden.

**8.2.4** Vor Prüfbeginn sind mit einem Mikroskop Subkonfluenz und Morphologie der Kulturen zu überprüfen.

In Ausnahmefällen darf die Aussaat zu Beginn der Prüfung mit exponentiell wachsenden Zellen (z. B. primäre Zellen, schnell proliferierende Zellen) erfolgen.

**8.2.5** Die Prüfung ist an

a) dem Originalextrakt

und/oder

b) dem Originalextrakt und einer Verdünnungsreihe der Extrakte, wobei das Extraktionsmedium als Verdünnungsmittel verwendet wird, durchzuführen.

**DIN EN ISO 10993-5:2009-10**  
**EN ISO 10993-5:2009 (D)**

Sofern Materialien mit begrenzter Löslichkeit bekannt sind oder ihr Vorhandensein vermutet wird, sollte die Verdünnung alternativ durch das Abwandeln des ursprünglichen Extraktionsverhältnisses von Prüfmuster zu Extraktionsmedium erreicht werden.

Wenn einschichtige Zellrasen für die Prüfung verwendet werden, ist das Kulturmedium von den Kulturen zu entfernen und zu verwerfen und ein Aliquot des Extrakts oder einer Verdünnung davon in jedes der Kulturgefäße zu geben.

Wenn die Prüfung an suspendierten Zellen vorgenommen wird, ist der Extrakt oder eine Verdünnung davon unmittelbar nach Herstellung der Zellsuspension in jedes der Kulturgefäße für die Parallelproben zu geben.

**8.2.6** Wenn ein nicht physiologischer Extrakt, z. B. Wasser, verwendet wird, ist der Extrakt mit der höchsten physiologisch verträglichen Konzentration nach der Verdünnung im Kulturmedium zu prüfen.

ANMERKUNG Konzentriertes Kulturmedium, z. B. 2fach, 5fach, wird für die Verdünnung wässriger Extrakte empfohlen.

**8.2.7** Bekannte Aliquote der Blindprobe sowie der Negativkontrolle und der Positivkontrolle werden in zusätzliche Kulturgefäße für Parallelproben gegeben.

ANMERKUNG Sofern geeignet, kann auch eine Kontrolle aus frischem Kulturmedium geprüft werden.

**8.2.8** Die Kulturgefäße sind unter denselben Bedingungen, wie in 8.2.3 beschrieben, über einen geeigneten Zeitraum, in Übereinstimmung mit dem gewählten speziellen Verfahren, zu bebrüten.

**8.2.9** Nach einer Bebrütungsdauer von mindestens 24 h sind die zytotoxischen Wirkungen nach 8.5 zu bestimmen.

### **8.3 Prüfung durch direkten Kontakt**

**8.3.1** Diese Prüfung erlaubt sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Beurteilung der Zytotoxizität.

**8.3.2** Ein bekanntes Aliquot der ständig umgerührten Zellsuspension ist zur direkten Exposition des Prüfmusters in jedes der in ausreichender Anzahl vorhandenen Kulturgefäße zu pipettieren. Die Zellen sind durch vorsichtiges horizontales Schwenken gleichmäßig über die Oberfläche jedes Kulturgefäßes zu verteilen.

**8.3.3** Die Kulturen sind bei  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  an Luft mit oder ohne Kohlendioxid, je nach Eignung für das Puffersystem, das für das Kulturmedium gewählt wurde, zu bebrüten, bis die Kulturen bis zur Subkonfluenz gewachsen sind.

**8.3.4** Vor Prüfbeginn sind mit einem Mikroskop Subkonfluenz und Morphologie der Kulturen zu überprüfen.

In Ausnahmefällen darf die Aussaat zu Beginn der Prüfung mit exponentiell wachsenden Zellen (z. B. primäre Zellen, schnell proliferierende Zellen) erfolgen.

**8.3.5** Das Kulturmedium ist zu entfernen und zu verwerfen. Anschließend ist frisches Kulturmedium in jedes Kulturgefäß zu geben.

**8.3.6** Vorsichtig sind einzelne Probekörper des Prüfmusters auf die Zellschicht in der Mitte jedes Kulturgefäßes für Parallelproben zu geben. Es ist sicherzustellen, dass der Probekörper ungefähr ein Zehntel der Oberfläche der Zellschicht bedeckt.

Sofern gerechtfertigt, dürfen andere Verhältnisse von Probekörperoberfläche zu Zellschichtoberfläche angewendet werden.

Es ist darauf zu achten, dass unnötige Bewegungen der Probekörper vermieden werden, da dies ein physikalisches Trauma an den Zellen verursachen könnte. Beispielsweise können durch eine unnötige Bewegung Stellen mit entfernten Zellen entstehen.



**ANMERKUNG** Wenn es angemessen ist, kann der Probekörper bereits vor der Zugabe der Zellen in das Kulturgefäß gegeben werden.

**8.3.7** Sowohl für das negative als auch für das positive Kontrollmaterial sind Kulturgefäße für Parallelproben vorzubereiten.

**8.3.8** Die Kulturgefäße sind unter denselben Bedingungen wie in 8.3.3 über einen geeigneten Zeitraum (mindestens 24 h), in Übereinstimmung mit dem gewählten speziellen Verfahren, zu bebrüten.

**8.3.9** Vor der Zugabe von Chemikalien/Farbstoffen zur Bestimmung von zytotoxischen Wirkungen in Übereinstimmung mit 8.5 ist überstehendes Kulturmedium zu verwerfen.

## **8.4 Prüfung durch indirekten Kontakt**

### **8.4.1 Agardiffusion**

**8.4.1.1** Diese Prüfung erlaubt eine qualitative Beurteilung der Zytotoxizität. Dieser Versuch ist nicht geeignet für herauslösbare Bestandteile, die nicht durch die Agarschicht diffundieren können, oder die möglicherweise mit Agar reagieren. Die Anwendung des Agardiffusionsversuchs für die Beurteilung der Zytotoxizität ist zu begründen.

**8.4.1.2** Ein bekanntes Aliquot der ständig umgerührten Zellsuspension ist in jedes der für die Prüfung in ausreichender Anzahl vorhandenen Kulturgefäße für Parallelproben zu pipettieren. Die Zellen sind durch vorsichtiges horizontales Schwenken gleichmäßig über die Oberfläche jedes Kulturgefäßes zu verteilen.

**8.4.1.3** Die Kulturen sind bei  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  an Luft mit oder ohne Kohlendioxid, je nach Eignung für das Puffersystem, das für das Kulturmedium gewählt wurde, zu bebrüten, bis die Kulturen am Ende der logarithmischen Phase der Wachstumskurve annähernd konfluent gewachsen sind.

**8.4.1.4** Vor Prüfbeginn sind mit einem Mikroskop Subkonfluenz und Morphologie der Kulturen zu überprüfen.

**8.4.1.5** Das Kulturmedium ist aus dem Kulturgefäß zu entfernen und zu verwerfen. Dann ist frisches Kulturmedium, das Serum enthält, mit geschmolzenem Agar zu vermischen, bis eine endgültige Massenkonzentration des Agars von 0,5 % bis 2 % erreicht ist; ein ausreichendes Volumen ist in jedes Kulturgefäß zu pipettieren. Es darf nur Agar verwendet werden, der für das Wachstum von Säugetierzellen in Kulturen geeignet ist. Die Agar-Kulturmedium-Mischung sollte flüssig sein und bei einer Temperatur, die für Säugetierzellen geeignet ist, gehalten werden.

**ANMERKUNG** Agar ist mit verschiedenen Molekulargewichten und in verschiedenen Reinheitsgraden erhältlich.

**8.4.1.6** Vorsichtig sind Parallelprobekörper des Prüfmusters auf die verfestigte Agar-Schicht in jedes Kulturgefäß zu geben. Es ist sicherzustellen, dass der Probekörper ungefähr ein Zehntel der Oberfläche der Zellschicht bedeckt.

Sofern gerechtfertigt, dürfen andere Verhältnisse von Probekörperoberfläche zu Zellschichtoberfläche angewendet werden.

Absorbierende Materialien sind vor dem Aufbringen auf den Agar mit Kulturmedium zu tränken, um ein Austrocknen des Agars zu verhindern.

**8.4.1.7** Sowohl mit dem negativen als auch mit dem positiven Kontrollmaterial sind Kulturgefäße für Parallelproben vorzubereiten.

**8.4.1.8** Die Kulturgefäße sind unter denselben Bedingungen, wie in 8.4.1.3 beschrieben, für 24 h bis 72 h zu bebrüten.

## DIN EN ISO 10993-5:2009-10

### EN ISO 10993-5:2009 (D)

**8.4.1.9** Die Zellen sind vor und nach dem vorsichtigen Entfernen der Probekörper vom Agar zur Bestimmung zytotoxischer Wirkungen zu untersuchen.

Die Verwendung eines Vitalfarbstoffes, z. B. Neutralrot, kann beim Nachweis der Zytotoxizität hilfreich sein. Der Vitalfarbstoff darf vor oder nach der Bebrütung mit dem Probekörper hinzugefügt werden. Wenn der Farbstoff vor der Bebrütung zugesetzt wird, sind die Kulturen gegen Licht zu schützen, um eine Zellschädigung, hervorgerufen durch die Photoaktivierung des Farbstoffes, zu verhindern.

## 8.4.2 Filterdiffusion

**8.4.2.1** Diese Prüfung erlaubt eine qualitative Beurteilung der Zytotoxizität.

**8.4.2.2** Für die Prüfung ist ein tensidfreies Filter mit einer Porenweite von  $0,45\ \mu\text{m}$  in jedes Kulturgefäß zu legen und ein bekanntes Aliquot der ständig umgerührten Zellsuspension in jedes der in ausreichender Anzahl zur Verfügung stehenden Kulturgefäße für Parallelproben zu geben. Die Zellen sind durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig über die Oberfläche jedes Filters zu verteilen.

**8.4.2.3** Die Kulturen sind bei  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  an Luft mit oder ohne Kohlendioxid, je nach Eignung für das Puffersystem, das für das Kulturmedium gewählt wurde, zu bebrüten, bis die Kulturen am Ende der logarithmischen Phase der Wachstumskurve annähernd konfluent gewachsen sind.

**8.4.2.4** Das Kulturmedium ist aus den Kulturgefäßen zu entfernen und zu verwerfen. Anschließend sind die Filter, mit der Zellseite nach unten, auf eine Schicht verfestigten Agars (siehe 8.4.1.5) zu legen.

**8.4.2.5** Vorsichtig sind die Parallelprobekörper des Prüfmusters auf die den Zellen abgewandte (obere) Seite des Filters zu legen. Flüssige Extrakte und frisch angemischte Verbindungen sind in reaktionsunfähigen Ringen auf dem Filter zurückzuhalten.

**8.4.2.6** Parallelfiler sind sowohl mit negativen als auch mit positiven Kontrollmaterialien herzustellen.

**8.4.2.7** Die Kulturgefäße sind unter denselben Bedingungen, wie in 8.4.2.3 beschrieben, für  $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$  zu bebrüten.

**8.4.2.8** Vorsichtig sind die Probekörper vom Filter zu entfernen und das Filter ist vorsichtig von der Agaroberfläche abzunehmen.

**8.4.2.9** Mit einem geeigneten Färbeverfahren sind die zytotoxischen Wirkungen zu bestimmen.

## 8.5 Bestimmung der Zytotoxizität

**8.5.1** Die zytotoxischen Wirkungen sind entweder auf qualitative oder quantitative Weise zu bestimmen. Die quantitative Bewertung der Zytotoxizität ist vorzuziehen. Qualitative Verfahren sind für Screening-Zwecke geeignet.

**Qualitative Bewertung:** Die Zellen sind unter dem Mikroskop, falls verlangt unter Anwendung einer zytochemischer Anfärbung, zu untersuchen. Zu beurteilen sind Veränderungen von, z. B. der allgemeinen Morphologie, der Vakuolisierung, der Ablösung, der Zellauflösung und der Zellmembranintegrität. Die Abweichungen von der normalen Morphologie sind im Prüfbericht in beschreibender Form oder zahlenmäßig anzugeben. Eine zweckmäßige Verfahrensweise zur Gradeinteilung der Prüfmuster ist in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

**Tabelle 1 — Qualitative morphologiebezogene Gradeinteilung der Zytotoxizität von Extrakten**

Gradeinteilung	Reaktivität	Zustand aller Kulturen
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

**Tabelle 2 — Gradeinteilung der Reaktivität bei den Agar- und Filterdiffusionsversuchen und der Prüfung durch direkten Kontakt**

Gradeinteilung	Reaktivität	Beschreibung der Reaktivitätszone
0	Keine	Keine nachweisbare Zone unter dem Probekörper oder um ihn herum
1	Gering	Einige fehlgebildete oder degenerierte Zellen unter dem Probekörper
2	Leicht	Auf die Fläche unter dem Probekörper begrenzte Zone
3	Mäßig	Zone erstreckt sich bis 1,0 cm über den Probekörper hinaus
4	Stark	Zone erstreckt sich mehr als 1,0 cm über den Probekörper hinaus

Die Verfahren zur Beurteilung und die Ergebnisse der Beurteilung müssen im Prüfbericht angegeben werden.

Das Erreichen einer numerischen Gradeinteilung von mehr als 2 nach den Tabellen 1 und 2 wird als zytotoxische Wirkung angesehen.

**Quantitative Bewertung:** Zu messen sind Zelltod, Hemmung des Zellwachstums, Zellproliferation oder Koloniebildung. Die Anzahl der Zellen, die Proteinmenge, die Freisetzung von Enzymen, die Freisetzung von Vitalfarbstoffen, die Reduktion von Vitalfarbstoffen oder andere messbare Parameter können durch objektive Mittel quantifiziert werden. Das objektive Maß und die Reaktion müssen im Prüfbericht angegeben werden.

Eine Reduktion der Lebensfähigkeit von Zellen um mehr als 30 % wird als eine zytotoxische Wirkung angesehen. Weitere Kriterien, einschließlich verschiedener Grenzwerte oder eines annehmbaren Verhältnisses der Prüfergebnisse und Ergebnisse der Kontrollen, müssen für alternative Zelllinien oder mehrschichtige Gewebekonstrukte gerechtfertigt sein. Die Kriterien müssen begründet und dokumentiert werden.

Die in den Anhängen A bis D beschriebenen Protokolle dürfen zur quantitativen Bestimmung der Zytotoxizität von Extrakten verwendet werden.

**ANMERKUNG** Protokoll A und B haben sich bei internationalen Validitätsstudien als geeignet für Chemikalien und bei einem internationalen Ringversuch als geeignet für Medizinprodukte erwiesen. Sie erlauben durch die Berechnung eines  $IC_{50}$ -Wertes (Konzentration, die den entsprechenden Endpunkt um 50 % hemmt) eine abgestufte Bestimmung der

# **DIN EN ISO 10993-5:2009-10** **EN ISO 10993-5:2009 (D)**

Zytotoxizität für zytotoxische Materialien. Anhänge C und D beschreiben andere in breitem Umfang angewendete Protokolle zur quantitativen Bestimmung der Zytotoxizität.

Bei bestimmten Verfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität kann eine Nullzeit oder eine Zellkulturkontrolle unter Ausgangsbedingungen notwendig sein.

**8.5.2** Es ist sicherzustellen, dass die Bewertungsverfahren sorgfältig ausgewählt werden, da die Prüfergebnisse ungültig sein können, wenn das Prüfmuster Substanzen freisetzt, die das Prüfsystem oder die Messung stören.

Materialien, die möglicherweise Formaldehyd abgeben, können nur dann zuverlässig geprüft werden, wenn die Lebensfähigkeit der Zellen beurteilt wurde.

**8.5.3** Wenn bei dem Prüfergebnis für Kulturgefäße von Parallelproben offensichtliche Unterschiede vorliegen, dann ist die Prüfung entweder nicht geeignet oder ungültig. In diesem Fall muss die Prüfung wiederholt oder ein alternatives Verfahren angewendet werden.

**8.5.4** Wenn die Negativ-, Positiv- oder andere Kontrollen (Referenzprobe, Medium, Blindprobe, Reagens usw.) nicht die erwartete Reaktion im Prüfsystem liefern, dann ist (sind) der (die) gesamte (gesamten) Versuch(e) zu wiederholen.

## **9 Prüfbericht**

Der Prüfbericht muss mindestens die folgenden Einzelheiten enthalten:

- a) Name und Anschrift der Prüfeinrichtung;
- b) Name(n) der Person(en), die die Prüfung durchgeführt hat (haben);
- c) Datum des Beginns und des Endes der Prüfung;
- d) Beschreibung der Probe;
- e) Zelllinie, Begründung der Auswahl und Bezugsquelle(n) der Zellen;
- f) bei Verwendung, Firmenname und Charge von Medium, Serum und Antibiotika;
- g) Versuchsverfahren und Begründung;
- h) Extraktionsverfahren (sofern zutreffend) und, sofern möglich, die Art und Konzentration der herausgelösten Substanz(en);
- i) Negativkontrolle, Positivkontrolle und andere Kontrollen;
- j) Zellreaktion und andere Beobachtungen;
- k) alle anderen, für die Beurteilung der Ergebnisse erforderlichen relevanten Daten.

## **10 Beurteilung der Ergebnisse**

Die Gesamtbeurteilung der Prüfergebnisse ist von einer Person vorzunehmen, die in der Lage ist, auf der Grundlage der Prüfdaten sachlich begründete Entscheidungen zu treffen. Zytotoxizitätswerte müssen in Bezug auf andere Daten der Biokompatibilität und die vorgesehene Anwendung des Produktes beurteilt werden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Zytotoxizitätsprüfung ist die Einteilung des Medizinproduktes nach ISO 10993-1 zu berücksichtigen.

Sofern eine zytotoxische Wirkung vorliegt, können weitere Bewertungen durchgeführt werden, z. B.

- a) zusätzliche Prüfungen (Vorhandensein/Nichtvorhandensein von Serum, Änderung der Serumkonzentration im Kulturmedium);
- b) Extraktanalyse (z. B. Rückstände des Sterilisationsprozesses und weiterer Herstellprozesse), sofern zutreffend;
- c) Konzentrations-Wirkungs-Analyse von Verdünnungen;
- d) chemische Charakterisierung von herauslösbaren Bestandteilen;
- e) weitere Prüfverfahren.

Jede beliebige zytotoxische Wirkung kann von Bedeutung sein. Es ist jedoch in erster Linie ein Hinweis auf die Möglichkeit einer *In-vivo*-Toxizität und es kann nicht zwangsläufig ausschließlich aufgrund der Zytotoxizitätswerte bestimmt werden, dass das Medizinprodukt für eine gegebene klinische Anwendung ungeeignet ist.

## **Anhang A**

### **(informativ)**

## **Zytotoxizitätsprüfung durch Aufnahme von Neutralrot**

### **A.1 Allgemeines**

Das nachfolgende Prüfprotokoll beruht auf dem Anhang C im Literaturhinweis [1], und beschreibt nur die entsprechenden Teile, die für diese Prüfung relevant sind.

### **A.2 Versuchsdurchführung**

#### **A.2.1 Grundlegendes Verfahren**

Mit BALB/c 3T3-Zellen wird eine Kultur auf 96-Well-Platten angelegt und als Kultur für 24 h (etwa eine Verdopplungsperiode) gehalten, um eine semikonfluente Einschichtkultur zu bilden (siehe [5] zu weiteren Informationen bezüglich der Zellerhaltung und der Kulturverfahren). Sie werden anschließend der Prüfverbindung in einem Bereich unterschiedlicher Konzentrationen ausgesetzt. Nach einer Einwirkzeit von 24 h wird die Neutralrotaufnahme (NRU) für jede Behandlungskonzentration bestimmt und mit dem Wert verglichen, der an Kontrollkulturen bestimmt wurde. Für jede Behandlung (d. h., Konzentration der Prüfchemikalie) wird die prozentuale Hemmung des Wachstums berechnet, wenn der Extrakt auf die Zellen zytotoxisch wirkt. Der  $IC_{50}$  (d. h., die Konzentration, die eine 50 %-ige Reduktion der NR-Aufnahme erzeugt) wird aus der konzentrationsabhängigen Wirkung berechnet und als prozentuale Verdünnung des Extrakts angegeben. Der reine Extrakt wird als 100 %-iges Extrakt bezeichnet.

#### **A.2.2 Material**

##### **A.2.2.1 Zelllinie**

BALB/c 3T3-Zellen, Klon 31 (z. B. ECACC 86110401, European Collection of Cell Cultures (Europäische Sammlung von Zellkulturen), Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, GB; CCL-163, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA) und JCRB 9005, hergestellt aus CCL-163 [ATCC], Human Science Research Resources Bank, Osaka, Japan.

##### **A.2.2.2 Technische Ausrüstung**

**A.2.2.2.1 Brutschrank**, 37 °C, befeuchtet, 5 % CO<sub>2</sub>/Luft [alternativ darf, bei Nichtvorhandensein eines geeigneten Puffers im Zellkulturmedium, 7,5 % CO<sub>2</sub>/Luft angewendet werden, da die Zellen sehr empfindlich auf pH-Änderungen reagieren. In den meisten Laboratorien werden jedoch eher 5 % angewendet, wobei HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) zum besseren Puffern zugesetzt wird.

**A.2.2.2.2 Sicherheitswerkbank**, Standard: „Biogefährdung“.

**A.2.2.2.3 Wasserbad**, 37 °C.

**A.2.2.2.4 Umkehrmikroskop mit Phasenkontrast**.

**A.2.2.2.5 Laborbrenner**.

**A.2.2.2.6 Zentrifuge** (wahlweise mit Mikrotiterplattenrotor ausgestattet).

**A.2.2.2.7 Laborwaage.**

**A.2.2.2.8 Photometer** mit 540-nm-Filter für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen.

**A.2.2.2.9 Schüttelgerät** für Mikrotiterplatten.

**A.2.2.2.10 Zellzähler** oder **Hämozytometer**.

**A.2.2.2.11 Pipettierhilfe.**

**A.2.2.2.12 Pipetten, 8-Kanal-Pipetten, Verdünnungsblock.**

**A.2.2.2.13 Kryoröhrchen.**

**A.2.2.2.14 Gewebekulturflaschen** (80 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>).

**A.2.2.2.15 Gewebekultur-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen.**

**A.2.2.3 Chemikalien, Medien und Seren**

**A.2.2.3.1 Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM)** ohne L-Glutamin

**A.2.2.3.2 L-Glutamin**, 200 mM oder **Glutamax**.

**A.2.2.3.3 Serum neugeborener Kälber (NBCS).**

**WICHTIG — Fetales Kälberserum (FCS) darf nicht verwendet werden. FCS führt aufgrund der Bildung von Vakuolen in den Zellen zu einer stark reduzierten O.D..**

Infolge von Schwankungen der NBCS-Chargen ist zuerst eine Charge mit 3T3-Zellen (20 h bis 25 h Verdopplungszeit) auf wachstumsfördernde Eigenschaften zu überprüfen und anschließend ist eine ausreichende Menge NBCS zurückzustellen.

**A.2.2.3.4 Trypsin-/EDTA-Lösung.**

**A.2.2.3.5 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)** ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (für Trypsinierung).

**A.2.2.3.6 HEPES** (siehe A.2.2.2.1).

**A.2.2.3.7 PBS**, mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (zum Spülen).

**A.2.2.3.8 Penicillin-/Streptomycin-Lösung.**

**A.2.2.3.9 Neutralrot (NR).**

**A.2.2.3.10 Dimethylsulfoxid (DMSO)**, analysenrein.

**A.2.2.3.11 Ethanol (ETOH)**, analysenrein.

**A.2.2.3.12 Eisessig**, analysenrein.

**A.2.2.3.13 Destilliertes Wasser** oder **jedes gereinigte, zur Zellkultivierung geeignete Wasser.**

#### **A.2.2.4 Vorbereitungen**

##### **A.2.2.4.1 Allgemeines**

Alle Lösungen (mit Ausnahme von NR-Stammlösung, NR-Medium und NR-Desorptionslösung), Glasgeräte usw. müssen steril sein und alle Verfahren sollten unter aseptischen Bedingungen und in der sterilen Umgebung einer Sicherheitswerkbank (Standard für Biogefährdung) durchgeführt werden.

##### **A.2.2.4.2 Medien**

DMEM (mit Natriumbicarbonat gepuffert) ergänzt mit (Endkonzentrationen in DMEM sind angegeben):

###### **(A) Zum Einfrieren**

— 20 % NBCS

— 7 % bis 10 % DMSO

###### **(B) Für Routinekultur**

— 10 % NBCS

— 4 mM L-Glutamin oder Glutamax

— 100 IE/ml Penicillin

— 100 µg/ml Streptomycin

— 20 mM HEPES

###### **(C) Zur Behandlung mit Prüfmustern**

— 5 % NBCS

— 4 mM Glutamin oder Glutamax

— 100 IE/ml Penicillin

— 100 µg/ml Streptomycin

— 20 mM HEPES

Vollständige Medien sollten bei 4 °C aufbewahrt und nicht länger als zwei Wochen gelagert werden.

Die Serumkonzentration des Behandlungsmediums wird auf 5 % reduziert, da Serumproteine die Toxizität der Prüfschubstanz verschleiern können. Serum kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da bei dessen Fehlen das Zellwachstum deutlich verringert wird.

##### **A.2.2.4.3 Neutralrot(NR)-Stammlösung**

— 0,4 g NR-Farbstoff

— 100 ml H<sub>2</sub>O



Ist vor Gebrauch herzustellen und unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur für bis zu zwei Monate zu lagern. Handelsübliche Neutralrot-Stammlösungen dürfen bis zu ihrem Verfallsdatum verwendet werden, wenn sie entsprechend den Angaben auf dem Etikett gelagert wurden.

#### A.2.2.4.4 Neutralrot-Medium (NR-Medium)

- 1 ml NR-Stammlösung
- 79 ml DMEM

Vor der Zugabe der Zellen sollte das NR-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 600 g für 10 min zentrifugiert werden (um NR-Kristalle abzuscheiden). Alternative Verfahren (z. B. Millipor-Filtration) können angewendet werden, sofern diese sicherstellen, dass das NR-Medium frei von Kristallen ist. Aliquote Anteile des NR-Mediums sollten vor der Zugabe zu den Zellen bei 37 °C (z. B. in einem Wasserbad) gehalten werden. Diese sollten innerhalb von 30 min nach der Herstellung und innerhalb von 15 min nach der Entnahme aus der Lagerung bei 37 °C verwendet werden.

#### A.2.2.4.5 Ethanol-/Eisessig-Lösung (NR-Desorptionslösung)

- 1 % Eisessig-Lösung
- 50 % Ethanol
- 49 % H<sub>2</sub>O

Die Lösung ist unmittelbar vor der Verwendung herzustellen. Sie darf nicht länger als 1 h gelagert werden.

#### A.2.2.4.6 Herstellung des Probenextrakts

Die Proben werden in Übereinstimmung mit ISO 10993-12 extrahiert.

### A.2.3 Verfahren

#### A.2.3.1 Allgemeines

Zu Routineverfahren der Zellkultivierung siehe Anhang C im Literaturhinweis [1].

#### A.2.3.2 Qualitätsüberprüfung des Versuchs (I); Positivkontrolle (PC)

Eine Positivkontrolle muss in jede Zytotoxizitätsprüfung einbezogen werden.

Von den zahlreichen Chemikalien, über die es ausreichende historische Daten oder Wiederholprüfungen im Labor und in Ringversuchen gibt, ist Natriumlaurylsulfat (SLS, CAS-Nr. 151-21-3) eine der am häufigsten geprüften Chemikalien und wird folglich als Positivkontrolle empfohlen. Es wird empfohlen, SLS in einer vierstufigen Konzentrationsskala zu prüfen: 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,2 mg/ml.

Der historische Mittelwert der  $IC_{50}$  von SLS (Spielmann u. a., 1991<sup>[10]</sup>) beträgt 0,093 mg/ml.

Der 95 %-Vertrauensbereich liegt zwischen 0,070 mg/ml und 0,116 mg/ml.

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn der  $IC_{50}$  für SLS innerhalb des 95 %-Vertrauensbereichs liegt.

Die Verwendung von positiven Referenzmaterialien und negativen Referenzmaterialien wird empfohlen [z. B. ZDEC und ZDBC (siehe Fußnote 1 auf Seite 6 sowie 3.2 und 3.4)].

# DIN EN ISO 10993-5:2009-10

## EN ISO 10993-5:2009 (D)

### A.2.3.3 Qualitätsüberprüfung des Versuchs (II); Blindprobe

Der in der unbehandelten Blindprobe erhaltene Absolutwert (nicht auf die Blindprobe bezogen) der optischen Dichte ( $OD_{540}$  von NRU) zeigt an, ob die je Vertiefung ausgesäten  $1 \times 10^4$  Zellen bei üblicher Verdopplungszeit während der zwei Versuchstage exponentiell gewachsen sind.

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn der Mittelwert von  $OD_{540}$  der Blindproben  $\geq 0,3$  beträgt.

Zur Überprüfung auf systematische Fehler bei der Zellaussaat werden Blindproben unter Extraktionsbedingungen (siehe A.2.2.4.6) behandelt und sowohl an der linken Seite (Reihe 2) als auch an der rechten Seite (Reihe 11) der 96er Mikrotiterplatte angeordnet (die Reihen 1 und 12 dürfen nicht verwendet werden; zur Probenverteilung auf der Platte siehe Anhang E im Literaturhinweis [1]).

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn der linke und der rechte Mittelwert der Blindproben um nicht mehr als 15 % vom Mittelwert aller Blindproben abweichen.

Überprüfungen auf Fehler bei der Zellaussaat können auch durch das Untersuchen jeder Platte unter einem Phasenkontrastmikroskop erfolgen, um sicherzustellen, dass die Zellquantität gleichmäßig ist. Durch die mikroskopische Bewertung erübrigt sich die Notwendigkeit von zwei Reihen von Blindproben.

### A.2.3.4 Qualitätsüberprüfung der konzentrationsabhängigen Wirkung

Die aus der konzentrationsabhängigen Wirkung abgeleitete  $IC_{50}$  sollte durch mindestens zwei, oder, sofern möglich, durch drei Werte zwischen 10 % und 90 % Hemmung der NRU gestützt werden. Wenn das nicht der Fall ist und der Konzentrationssteigerungsfaktor leicht reduziert werden kann, ist der Versuch zu verwerfen und mit einem kleineren Steigerungsfaktor zu wiederholen.

### A.2.3.5 Konzentrationen der Prüfmusterextrakte

#### A.2.3.5.1 Vorversuch zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs

Zu prüfen sind acht Konzentrationen der Prüfmusterextrakte durch Verdünnen der Stammlösung mit einem konstanten Faktor, der einen großen Bereich einschließt, z. B. halblogarithmische Intervalle. Wenn die Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellkultur mit der höchsten Konzentration 30 % oder weniger beträgt, dann ist das Material als nicht zytotoxisch zu betrachten und es ist kein weiterer Hauptversuch notwendig.

#### A.2.3.5.2 Hauptversuch

In Abhängigkeit vom Anstieg der aus der Ermittlung des Konzentrationsbereichs abgeschätzten konzentrationsabhängigen Wirkungs-Kurve sollte der Verdünnungs-/Steigerungsfaktor in den Konzentrationsreihen des Hauptversuchs kleiner sein (z. B.  $\sqrt[6]{10} = 1,47$ ). Es ist zu versuchen, den entsprechenden Konzentrationsbereich (zwischen 10 % und 90 % Wirkung) mit mindestens drei Werten einer abgestuften Wirkung abzudecken, wobei zu viele nicht zytotoxische und/oder 100 % zytotoxische Konzentrationen zu vermeiden sind.

### A.2.3.6 Durchführung der Prüfung

**WICHTIG — Nach dem Auftauen aus dem Vorrat sind die Zellen vor der Verwendung in der Prüfung zwei bis dreimal zu passagieren.**

Tabelle A.1 stellt den Arbeitsablauf des Prüfverfahrens dar.

#### Erster Tag

— Es ist eine Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in Kulturmedium herzustellen. Mit einer Mehrkanalpipette sind 100  $\mu$ l Kulturmedium ausschließlich in die peripheren Vertiefungen einer 96er Gewebekultur-Mikro-

titerplatte zu verteilen (= Blindproben, siehe Anhang E im Literaturhinweis [1]). In die verbleibenden Vertiefungen sind 100 µl einer Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen/ml ( $= 1 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung) zu verteilen. Herzustellen ist eine Platte für jeden zu prüfenden Probenextrakt, eine Platte für die Positivkontrolle (PC) und eine Platte für das negative Kontrollmaterial, sofern vorhanden.

- Die Zellen sind für 24 h zu bebrüten (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, > 90 % Feuchte), damit die Zellen einen semikonfluenten einschichtigen Zellrasen bilden. Diese Bebrütungsdauer stellt die Erholung und das Anhaften der Zellen sowie den Übergang zur exponentiellen Wachstumsphase sicher.
- Jede Platte ist unter einem Phasenkontrastmikroskop zu untersuchen, um sicherzustellen, dass das Zellwachstum relativ gleichmäßig über die Mikrotiterplatte verteilt ist. Diese Überprüfung dient dem Feststellen von Versuchsfehlern.

### Zweiter Tag

- Nach einer Bebrütungsdauer von 24 h ist das Kulturmedium von den Zellen abzusaugen.
- Je Vertiefung sind 100 µl Behandlungsmedium hinzuzufügen, das entweder die geeignete Konzentration des Probenextraktes, oder die Negativkontrolle, oder die Positivkontrolle oder nichts außer dem Extraktionsmedium (Blindprobe) enthält.
- Die Zellen sind für 24 h (bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C, > 90 % Feuchte) zu bebrüten.

### Dritter Tag

Nach einer Behandlungsdauer von 24 h ist jede Platte unter einem Phasenkontrastmikroskop auf systematische Fehler bei der Zellaussaat und Wachstumseigenschaften der Kontrolle und der behandelten Zellen zu untersuchen. Veränderungen in der Morphologie der Zellen infolge zytotoxischer Wirkungen des Prüfmusterextrakts sind aufzuzeichnen, diese Aufzeichnungen dürfen jedoch nicht zur Berechnung der höchsten tolerierbaren Dosis (HTD) oder jedes anderen quantitativen Maßes der Zytotoxizität verwendet werden. Unerwünschte Wachstumseigenschaften von Kontrollzellen weisen möglicherweise auf einen Versuchsfehler hin und können als Grund dienen, den Versuch zu verwerfen.

Die Messung der NRU beruht auf der von Ellen Borenfreund (Borenfreund und Puerner<sup>[3]</sup>) durchgeführten Messung. Die Aufnahme von Neutralrot in die Lysosome/Endosome und Vakuolen lebender Zellen wird als ein quantitativer Hinweis auf die Zellzahl und die Lebensfähigkeit verwendet.

- Die Zellen sind mit 150 µl angewärmtem PBS zu waschen. Durch leichtes Beklopfen ist die Waschlösung zu entfernen. Es sind 100 µl NR-Medium zuzusetzen und es ist bei 37 °C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> für 3 h zu bebrüten.
- Nach dem Bebrüten ist das NR-Medium zu entfernen und die Zellen sind mit 150 µl PBS zu waschen.
- PBS ist zu dekantieren und vollständig abzutupfen. (Wahlweise, Zentrifugieren der umgedrehten Platte).
- Es sind 150 µl NR-Desorptionslösung (ETOH/Essigsäure) allen Vertiefungen, einschließlich Blindproben zuzusetzen.
- Die Mikrotiterplatte ist für 10 min auf einem Mikrotiterplatten-Schüttelgerät schnell zu schütteln, bis NR aus den Zellen extrahiert ist und eine homogene Lösung gebildet hat.
- Die Absorption der sich ergebenden angefärbten Lösung ist bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät zu messen, wobei die Blindproben als Bezugsgröße zu verwenden sind. Die Rohdaten sind in einem Dateiformat (z. B. ASCII, TXT, XLS), das für die weitere Analyse der konzentrationsabhängigen Wirkung und die Berechnung der IC<sub>50</sub> geeignet ist, zu speichern.

**Tabelle A.1 — Arbeitsablauf der 3T3-NRU-Zytotoxizitätsprüfung**

ZEIT h	DURCHFÜHRUNG
00:00	Aussaat auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen: $1 \times 10^4$ Zellen/100 µl DMEM Kulturmedium/Vertiefung Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /22 h bis 24 h) ↓
24:00	Kulturmedium entfernen ↓
24:00	Mit 8 Konzentrationen des Prüfmusterextrakts in Behandlungsmedium (100 µl) behandeln (unbehandelte Blindprobe = Behandlungsmedium) Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /24 h) ↓
48:00	Mikroskopische Beurteilung von morphologischen Veränderungen Behandlungsmedium entfernen Einmal mit 150 µl PBS waschen Zugabe von 100 µl NR-Medium Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /3 h) ↓
51:00	NR-Medium werfen Einmal mit 150 µl PBS waschen 150 µl desorbierendes NR-Fixiermittel zusetzen (ETOH/Essigsäurelösung) ↓
51:40	Platte für 10 min schütteln
51:50	Feststellen der NR-Extinktion bei 540 nm (d. h. Zellebensfähigkeit)

**A.2.4 Datenanalyse**

Eine Berechnung der Zellebensfähigkeit, angegeben als NRU, erfolgt für jede Konzentration des Prüfmusterextraktes unter Verwendung der mittleren NRU der sechs Werte der Parallelproben je Prüfkonzentration. Dieser Wert wird mit der mittleren NRU aller Blindproben-Werte verglichen (vorausgesetzt, die Blindproben haben die Annahmekriterien für Blindproben erfüllt). Die relative Zellebensfähigkeit wird anschließend als prozentualer Wert bezogen auf die Blindprobe angegeben. Sofern erreichbar sollten die acht Konzentrationen jeder geprüften Verbindung den Bereich von keiner Wirkung bis zur vollständigen Hemmung der Zellebensfähigkeit umfassen.

Wenn die relative Zellebensfähigkeit für die höchste Konzentration des Prüfmusterextraktes (100 % Extrakt) weniger als 70 % der Blindprobe beträgt, wird die Konzentration einer Prüfchemikalie, die eine 50%ige Hemmung der Zellebensfähigkeit darstellt (d. h.  $IC_{50}$ ) aus der konzentrationsabhängigen Wirkung bestimmt. Das kann durch die Anwendung einer der folgenden Vorgehensweisen erfolgen.

- Ein manuelles grafisches Anpassungs-Verfahren.  
Die Verwendung von Wahrscheinlichkeitspapier mit „X = log“ und „Y = Probit“-Maßeinteilung wird empfohlen, da in den meisten Fällen die Konzentrations-Wirkungs-Funktion in dem relevanten Bereich annähernd linear wird. Halblogarithmisches Papier kann für diese Verfahrensweise ebenfalls verwendet werden.
- oder
- jedes geeignete nichtlineare Regressionsverfahren (vorzugsweise eine Hill-Funktion<sup>4)</sup> oder eine logistische Regression) für die konzentrationsabhängigen Wirkungs-Werte.  
Vor der Verwendung der  $IC_{50}$  für weitere Berechnungen sollte die Qualität der Anpassung auf geeignete Weise überprüft werden.

Wenn die relative Zellebensfähigkeit für die höchste Konzentration des Prüfmusterextraktes (100 % Extrakt)  $\geq 70$  % der Blindprobe ist, dann muss das Material als nicht zytotoxisch betrachtet werden.

4) Hill-Funktionen sind monoton und S-förmig und stellen ein annehmbares Modell für viele Dosis-Wirkungs-Kurven dar.

## Anhang B (informativ)

### Zytotoxizitätsprüfung mittels Zellkoloniebildung

#### B.1 Allgemeines

Die Prüfvorschrift beruht auf Teil 1 der Zytotoxizitätsprüfung des japanischen Leitfadens für grundlegende biologische Prüfungen von medizinischen Materialien und Medizinprodukten. Siehe Literaturhinweis [2].

ANMERKUNG Das nachfolgende Protokoll beschreibt lediglich die für die Zytotoxizitätsprüfung relevanten Abschnitte von Teil 1.

#### B.2 Versuchsdurchführung

##### B.2.1 Grundlegendes Verfahren

V79-Zellen werden in Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und für 24 h als Kultur erhalten, um das Wachstum in einer logarithmischen Phase zu beginnen. Anschließend werden sie der Prüfverbindung in einem Bereich unterschiedlicher Konzentrationen ausgesetzt. Sie werden für 6 Tage bebrütet, damit die Kolonien ausreichend groß zum Auszählen sind. Die Kolonien werden mit Methanol fixiert, mit Giemsa-Lösung angefärbt und ausgezählt. Wenn der Extrakt auf die Zellen zytoxisch wirkt, wird der  $IC_{50}$  (die Konzentration, die die Klonierungseffizienz um 50 % hemmt) berechnet und als prozentualer Anteil des Extrakts angegeben.

##### B.2.2 Material

###### B.2.2.1 Zelllinie

V79-Zellen (JCRB 0603, Human Science Research Resources Bank, Osaka, Japan, verfügbar bei weiteren Zellbanken der USA und der EU).

ANMERKUNG Es werden V79-Zellen empfohlen, da sie große und deutliche Kolonien ausbilden.

###### B.2.2.2 Technische Ausrüstung

**B.2.2.2.1 Brutschrank**, 37 °C, befeuchtet, 5 % CO<sub>2</sub>/Luft.

**B.2.2.2.2 Sicherheitswerkbank**, Standard: „Biogefährdung“.

**B.2.2.2.3 Wasserbad**, 37 °C.

**B.2.2.2.4 Umkehrmikroskop mit Phasenkontrast**.

**B.2.2.2.5 Stereomikroskop**.

**B.2.2.2.6 Laborbrenner**.

**B.2.2.2.7 Laborwaage**.

**B.2.2.2.8 Zellzähler oder Hämozytometer**.

# **DIN EN ISO 10993-5:2009-10** **EN ISO 10993-5:2009 (D)**

## **B.2.2.2.9 Pipettierhilfe.**

## **B.2.2.2.10 Pipetten.**

## **B.2.2.2.11 Gewebekulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>) oder Gewebekulturschalen (Durchmesser 100 mm).**

## **B.2.2.2.12 Gewebekultur-Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen.**

## **B.2.2.3 Chemikalien, Medien und Seren**

### **B.2.2.3.1 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), das eine ausgewogene Earl-Salzlösung enthält.**

### **B.2.2.3.2 Fetales Kälberserum (FCS).**

ANMERKUNG Infolge von Schwankungen der FCS-Chargen ist zuerst eine Charge auf wachstumsfördernde Eigenschaften mit V79-Zellen zu überprüfen und anschließend ist eine ausreichende Menge FCS zurückzustellen.

### **B.2.2.3.3 Trypsin-/EDTA-Lösung.**

### **B.2.2.3.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (für Trypsinierung).**

### **B.2.2.3.5 Penicillin-/Streptomycin-Lösung.**

### **B.2.2.3.6 Dimethylsulfoxid (DMSO), analysenrein.**

### **B.2.2.3.7 Methanol, analysenrein.**

### **B.2.2.3.8 Giemsa-Lösung.**

### **B.2.2.3.9 Phosphatgepufferte Lösung.**

### **B.2.2.3.10 Destilliertes Wasser oder jedes gereinigte, zur Zellkultivierung geeignete Wasser.**

### **B.2.2.3.11 Natriumbicarbonat.**

### **B.2.2.3.12 L-Glutamin.**

### **B.2.2.3.13 MEM nichtessentielle Aminosäure-Lösung.**

### **B.2.2.3.14 Natriumpyruvat, 100 mM.**

## **B.2.2.4 Vorbereitungen**

### **B.2.2.4.1 Allgemeines**

Alle Lösungen (mit Ausnahme der Giemsa-Lösung), Glasgeräte usw. müssen steril sein und alle Verfahren sollten unter aseptischen Bedingungen und in der sterilen Umgebung einer Sicherheitswerkbank (Standard für Biogefährdung) durchgeführt werden.

### **B.2.2.4.2 Medien**

1 000 ml Eagle's MEM, mit folgenden Zusätzen:

(A) Zum Einfrieren und für Routinekulturen wird Medium mit 10 % FCS verwendet (MEM10)

— 111 ml FCS

— 2,2 g Natriumbicarbonat

— 0,292 g L-Glutamin

(B) Zur Extraktion und Behandlung wird Medium mit 5 % FCS verwendet (MEM05)

- 53,5 ml FCS
- 5 ml MEM nichtessentielle Aminosäure-Lösung
- 10 ml Natriumpyruvat, 100 mM
- 0,292 g L-Glutamin
- 2,2 g Natriumbicarbonat

Vollständige Medien sollten bei 4 °C aufbewahrt und nicht länger als 1 Monat gelagert werden.

Die Serumkonzentration des Behandlungsmediums wird auf 5 % reduziert, da Serumproteine die Toxizität der Prüfsubstanz verschleiern können. Serum kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da bei dessen Fehlen das Zellwachstum deutlich verringert wird. Eine geeignete Menge an Antibiotika darf den vorstehend angeführten Kulturmedien zugesetzt werden, sofern diese den Versuch nicht ungünstig beeinflussen.

#### **B.2.2.4.3 5%ige Giemsa-Lösung**

- 5 ml Giemsa-Lösung
- 95 ml phosphatgepufferte Lösung, jeder Art, pH-Wert 6,5 bis 7,5

Die Lösung ist unmittelbar vor dem Gebrauch herzustellen.

#### **B.2.2.4.4 Herstellung des Probenextrakts**

Proben werden nach ISO 10993-12 extrahiert, es wird jedoch ein Extraktionsverhältnis der Oberfläche je Extraktionsvolumen von 6 cm<sup>2</sup>/ml und der Masse je Extraktionsvolumen von 0,1 g/ml empfohlen. Siehe Literaturhinweise [6], [7] und [11].

Der Extrakt wird durch Dekantieren abgetrennt und als 100%igen Extrakt bezeichnet. Der 100%ige Extrakt wird mit MEM05-Medium verdünnt, um verschiedene prozentuale Gehalte an verdünntem Extrakt zu erhalten.

### **B.2.3 Verfahren**

#### **B.2.3.1 Allgemeines**

Zu Routineverfahren der Zellkultivierung siehe Anhang C im Literaturhinweis [1].

#### **B.2.3.2 Qualitätsüberprüfung des Versuchs (I); Positivkontrolle (PC) und Negativkontrolle (NC)**

Positiv- und Negativkontrollen sind in jede Zytotoxizitätsprüfung einzubeziehen. Es werden positive und negative Referenzmaterialien empfohlen, z. B. ZDEC und ZDBC (siehe Fußnote 1 auf Seite 6).

Die folgenden Annahmekriterien für ZDEC und ZDBC sollten angewendet werden

- a)  $IC_{50}$  für ZDEC sollte 7 % nicht überschreiten;
- b)  $IC_{50}$  für ZDBC sollte 80 % nicht überschreiten.

**DIN EN ISO 10993-5:2009-10**  
**EN ISO 10993-5:2009 (D)****B.2.3.3 Qualitätsüberprüfung des Versuchs (II); Blindprobe**

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn die mittlere Anzahl an Kolonien in der Blindprobe mindestens 70 % der je Vertiefung ausplattierten Anzahl der Zellen beträgt.

**B.2.3.4 Qualitätsüberprüfung der konzentrationsabhängigen Wirkung**

Die aus der konzentrationsabhängigen Wirkung abgeleitete  $IC_{50}$  sollte durch mindestens zwei, oder, sofern möglich, durch drei Reaktionen zwischen 10 % und 90 % Hemmung der Kontrolle gestützt werden. Wenn das nicht der Fall ist und der Konzentrationssteigerungsfaktor leicht reduziert werden kann, ist der Versuch zu verwerfen und mit einem kleineren Steigerungsfaktor zu wiederholen.

**B.2.3.5 Konzentrationen der Prüfmusterextrakte****B.2.3.5.1 Vorversuch zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs**

Zu prüfen sind vier Konzentrationen des Probenextraktes durch Verdünnen der Stammlösung mit einem konstanten Faktor, der einen großen Bereich einschließt, z. B.  $1 \geq 1/10 \geq 1/100 \geq 1/1\,000$ . Wenn die Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellkultur mit der höchsten Konzentration des Prüfmusterextraktes 30 % oder weniger beträgt, dann ist das Material als nicht zytotoxisch zu betrachten und es ist kein weiteres Hauptexperiment notwendig.

**B.2.3.5.2 Hauptversuch**

In Abhängigkeit vom Anstieg der aus der Bereichsermittlung abgeschätzten Konzentrations-Wirkungs-Kurve sollte der Verdünnungs-/Steigerungsfaktor in den Konzentrationsreihen des Hauptversuchs kleiner sein. Es ist zu versuchen, den entsprechenden Konzentrationsbereich (zwischen 10 % und 90 % Wirkung) mit mindestens drei Werten einer abgestuften Wirkung abzudecken, wobei zu viele nicht zytotoxische und/oder 100 % zytotoxische Konzentrationen zu vermeiden sind.

**B.2.3.6 Durchführung der Prüfung**

**WICHTIG — Nach dem Auftauen aus dem Vorrat sind die Zellen vor der Verwendung in der Prüfung zwei bis dreimal zu passagieren.**

**Erster Tag**

Es ist eine Zellsuspension aus 33,3 Zellen/ml in MEM05-Medium herzustellen. 3 ml der Suspension sind in jede Vertiefung einer 6er Mikrotiterplatte zu geben.

**Zweiter Tag**

Nach einer Bebrütungsdauer von 24 h ist das Kulturmedium aus jeder Vertiefung abzusaugen. 2 ml des mit MEM05-Medium hergestellten 100%igen oder verdünnten Extrakts sind hinzuzugeben. Jede Konzentration ist dreifach zu prüfen. Die Bebrütung erfolgt im Brutschrank für weitere 6 Tage.

**Achter Tag**

Das Behandlungsmedium ist aus jeder Vertiefung abzusaugen, die Vertiefung ist mit PBS zu spülen, die Kolonien sind mit Methanol zu fixieren und mit 5%igen Giemsa-Lösung anzufärben. Die Anzahl der Kolonien in jeder Vertiefung ist auszuzählen.



### B.2.3.7 Auswertung

- Die Vertiefungen sind mit einem Stereomikroskop zu beobachten und die Anzahl der Kolonien, die aus 50 oder mehr Zellen bestehen, ist in jeder Vertiefung auszuzählen.
- Die Anzahl der Kolonien in einer Vertiefung ist aufzuzeichnen.
- Es ist die durchschnittliche Koloniezahl für jede Extraktkonzentration zu berechnen.
- Diese Zahl ist durch die der Kontrollgruppe zu dividieren und der Quotient [der Anteil lebensfähiger Zellen (KE)] ist in Prozent anzugeben.
- Sofern die Klonierungseffizienz für die höchste Konzentration des Prüfmusterextraktes (100 % Extrakt) weniger als 70 % der Blindprobe beträgt, muss das Material als möglicherweise zytotoxisch betrachtet werden und die Zytotoxizität des Prüfmusters wird als  $IC_{50}$ -Wert angegeben.
- $IC_{50}$  (die Konzentration, die die KE auf 50 % hemmt) wird berechnet als die Dosis mit einer relativen Überlebensrate von 50 %, die aus der Linie ermittelt wird, die durch eine Dosis mit höherer Überlebensrate und einer Dosis mit niedrigerer Überlebensrate als 50 % verläuft.
- Wenn die Klonierungseffizienz  $\geq 70$  % der Blindprobe beträgt, dann ist das Material als nicht zytotoxisch zu betrachten.

ANMERKUNG Wenn die Klonierungseffizienz in seiner höchsten Konzentration zwischen 50 % und 70 % liegt, ist es nicht praktikabel den  $IC_{50}$ -Wert über der höchsten Konzentration zu berechnen.

### B.2.4 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss nach Abschnitt 9 erstellt werden und zusätzlich Folgendes enthalten:

- a) Kontroll-KE unter den gegebenen Bedingungen;
- b) sämtliche Prüfdaten, einschließlich Koloniezahl, Hemmkurven der Koloniebildung und, soweit möglich, die für die Prüfmuster erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte.

## Anhang C (informativ)

### Zytotoxizitätsprüfung mit MTT

#### C.1 Allgemeines

Die folgende Prüfvorschrift beruht auf der Messung der Lebensfähigkeit von Zellen über die Stoffwechselaktivität, siehe [9]. Das gelbe wasserlösliche MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in lebensfähigen Zellen metabolisch zu einem blau-violetten wasserunlöslichen Formazan reduziert. Die Anzahl lebensfähiger Zellen korreliert mit der durch photometrischen Messungen nach dem Lösen des Formazans in Alkohol bestimmten Farbintensität.

#### C.2 Versuchsdurchführung

##### C.2.1 Grundlegendes Verfahren

L929-Zellen werden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und als Kultur für 24 h (etwa eine Verdopplungsperiode) gehalten, um einen semikonfluenten einschichtigen Zellrasen zu bilden (siehe [5] zu weiteren Informationen bezüglich der Zellerhaltung und der Kultivierungsverfahren). Sie werden anschließend der Prüfverbindung in einem Bereich unterschiedlicher Konzentrationen ausgesetzt. Nach einer Expositionsdauer von 24 h wird die Formazanbildung für jede Behandlungskonzentration bestimmt und mit dem Wert verglichen, der an Kontrollkulturen bestimmt wurde. Für jede Behandlung wird die prozentuale Hemmung des Wachstums berechnet.

##### C.2.2 Material

###### C.2.2.1 Zelllinie

L-929-Zellen (NCTC Klon 929: CCL 1, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA; ECACC Nr. 88102702, European Collection of Cell Cultures (Europäische Sammlung von Zellkulturen), Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK). Zellkulturen müssen frei von Mycoplasmen sein.

###### C.2.2.2 Technische Ausrüstung

**C.2.2.2.1 Brutschrank**, 37 °C, befeuchtet, 5 % CO<sub>2</sub>/Luft

**C.2.2.2.2 Sicherheitswerkbank**, Standard: „Biogefährdung“.

**C.2.2.2.3 Wasserbad**, 37 °C.

**C.2.2.2.4 Umkehrmikroskop mit Phasenkontrast**..

**C.2.2.2.5 Laborbrenner**.

**C.2.2.2.6 Zentrifuge**, wahlweise mit Mikrotiterplattenrotor ausgestattet.

**C.2.2.2.7 Laborwaage**.

**C.2.2.2.8 Photometer** mit 570 nm-Filter (Referenz-Wellenlänge 650 nm) für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen.

**C.2.2.2.9 Schüttelgerät** für Mikrotiterplatten.

**C.2.2.2.10 Zellzähler** oder **Hämozytometer**.

**C.2.2.2.11 Pipettierhilfe**.

**C.2.2.2.12 Pipetten, 8-Kanal-Pipetten, Verdünnungsblock**.

**C.2.2.2.13 Kryoröhrchen**.

**C.2.2.2.14 Gewebekulturflaschen** oder **Gewebekultur-Petrischalen**.

**C.2.2.2.15 Gewebekultur-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen**.

### **C.2.2.3 Chemikalien, Medien und Seren**

**C.2.2.3.1 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)**, ohne Phenolrot, ohne Glutamin und ohne NaHCO<sub>3</sub>.

**C.2.2.3.2 Fetales Kälberserum (FCS)**.

**C.2.2.3.3 Trypsin-/EDTA-Lösung**.

**C.2.2.3.4 Phosphatgepufferte Saline (PBS)**.

**C.2.2.3.5 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)**.

**C.2.2.3.6 Isopropanol**, analysenrein.

### **C.2.2.4 Vorbereitungen**

#### **C.2.2.4.1 Allgemeines**

Alle Lösungen, Glasgeräte usw. müssen steril sein und alle Verfahren sollten unter aseptischen Bedingungen und in der sterilen Umgebung einer Sicherheitswerkbank (Standard für Biogefährdung) durchgeführt werden.

#### **C.2.2.4.1 Medien**

MEM (mit Natriumbicarbonat gepuffert) ergänzt mit (Endkonzentrationen in MEM sind angegeben):

##### **(A) Zum Einfrieren**

— 20 % FCS

— 7 % bis 10 % DMSO

##### **(B) Für Routinekultur**

— 10 % FCS

— 4 mM Glutamin oder Glutamax

— 100 IE/ml Penicillin

— 100 µg/ml Streptomycin

Vollständige Medien sollten bei 4 °C aufbewahrt und nicht länger als zwei Wochen gelagert werden.

# DIN EN ISO 10993-5:2009-10

## EN ISO 10993-5:2009 (D)

### C.2.2.4.3 MTT-Lösung

MTT wird frisch in MEM ohne Zusätze und ohne Phenolrot in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Mit Spritzenfiltern (Porengröße  $\leq 0,22 \mu\text{m}$ ) wird die Lösung durch Sterilfiltration sterilisiert. Die Lösung sollte am selben Tag verwendet werden.

### C.2.2.4.4 Herstellung des Probenextrakts

Die Proben werden in Übereinstimmung mit ISO 10993-12 extrahiert.

## C.2.3 Verfahren

### C.2.3.1 Allgemeines

Zu Routineverfahren der Zellkultivierung siehe Anhang C im Literaturhinweis [1].

### C.2.3.2 Qualitätsüberprüfung des Versuchs (I); Positivkontrolle (PC) und Negativkontrolle (NC)

Positiv- und Negativkontrollen sollten in jede Zytotoxizitätsprüfung einbezogen werden. Es werden positive und negative Referenzmaterialien empfohlen, z. B. ZDEC und ZDBC (siehe Fußnote 1 auf Seite 6).

### C.2.3.3 Qualitätsüberprüfung des Versuchs (II); Blindprobe

Der in der unbehandelten Blindprobe erhaltene Absolutwert der optischen Dichte,  $OD_{570}$ , zeigt an, ob die je Vertiefung ausgesäten  $1 \times 10^4$  Zellen bei üblicher Verdopplungszeit während der zwei Versuchstage exponentiell gewachsen sind.

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn der Mittelwert der  $OD_{570}$  der Blindproben  $\geq 0,2$  beträgt.

Zur Überprüfung auf systematische Fehler bei der Zellaussaat werden Blindproben sowohl an der linken Seite (Reihe 2) als auch an der rechten Seite (Reihe 11) der 96er Mikrotiterplatte angeordnet (die Reihen 1 und 12 dürfen nicht verwendet werden; zur Probenverteilung auf der Platte siehe Anhang E im Literaturhinweis [1]).

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn der linke und der rechte Mittelwert der Blindproben um nicht mehr als 15 % vom Mittelwert aller Blindproben abweichen.

Überprüfungen auf Fehler bei der Zellaussaat können auch durch das Untersuchen jeder Platte unter einem Phasenkontrastmikroskop erfolgen, um sicherzustellen, dass die Zellquantität gleichmäßig ist. Durch die mikroskopische Bewertung erübrigt sich die Notwendigkeit von zwei Reihen Blindproben.

### C.2.3.4 Durchführung der Prüfung

**WICHTIG — Nach dem Auftauen aus dem Vorrat sind die Zellen vor der Verwendung in der Prüfung zwei bis dreimal zu passagieren.**

Tabelle C.1 stellt den Arbeitsablauf des Prüfverfahrens dar.

### Erster Tag nach dem Heranwachsen der Zellen aus dem gefrorenen Vorrat

- Die Zellkulturen werden durch enzymatischen Verdau (Trypsin/EDTA) von den Kulturflaschen abgelöst und die Zellsuspension wird zentrifugiert (200 g, 3 min). Die Zellen werden anschließend im Kulturmedium wieder suspendiert und die Zellsuspension wird auf eine Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Mit einer Mehrkanalpipette sind 100  $\mu\text{l}$  reines Kulturmedium (Blindprobe) in die peripheren Vertiefungen einer 96er Gewebekultur-Mikrotiterplatte zu verteilen (= Blindproben, siehe Anhang E im Literaturhinweis [1]). In die verbleibenden Vertiefungen sind 100  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen/ml (=  $1 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung) zu verteilen.

- Die Zellen sind für 24 h zu bebrüten (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, > 90 % Feuchte), damit die Zellen einen semikonfluenten einschichtigen Zellrasen bilden. Diese Bebrütungsdauer stellt die Reaktivierung und das Anhaften der Zellen sowie den Übergang zur exponentiellen Wachstumsphase sicher.
- Jede Platte ist unter einem Phasenkontrastmikroskop zu untersuchen, um sicherzustellen, dass das Zellwachstum relativ gleichmäßig über die Mikrotiterplatte verteilt ist. Diese Überprüfung dient dem Feststellen von Versuchsfehlern.

### Zweiter Tag

- Nach einer Bebrütungsdauer von 24 h ist Kulturmedium von den Zellen abzusaugen.
- Je Vertiefung sind 100 µl Behandlungsmedium zuzusetzen, das entweder die geeignete Konzentration des Probenextraktes, die Negativkontrolle, die Positivkontrolle oder nichts außer der Blindprobe enthält. Mindestens vier unterschiedliche Konzentrationen des Prüfmusterextrakts oder des Extrakts der Positivkontrolle sollten geprüft werden. Die höchste verwendete Konzentration sollte 100 % Extrakt sein und die anderen Konzentrationen werden innerhalb eines einfach logarithmischen Bereichs entsprechend verteilt. Für die Negativkontrolle sollte ausschließlich der 100%ige Extrakt geprüft werden. Kulturmedium sollte als Blindprobe verwendet werden.
- Die Zellen sind für 24 h (bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C, > 90 % Feuchte) zu bebrüten.

### Dritter Tag

Nach einer Behandlungsdauer von 24 h ist jede Platte unter einem Phasenkontrastmikroskop auf systematische Fehler bei der Zellaussaat und Wachstumseigenschaften der Kontrolle und der behandelten Zellen zu untersuchen. Veränderungen in der Morphologie der Zellen infolge zytotoxischer Wirkungen des Prüfmusterextrakts sind aufzuzeichnen, diese Aufzeichnungen dürfen jedoch nicht für Berechnungen jedes beliebigen quantitativen Maßes der Zytotoxizität verwendet werden. Unerwünschte Wachstumseigenschaften von Kontrollzellen weisen möglicherweise auf einen Versuchsfehler hin und können als Grund dienen, den Versuch zu verwerfen.

Nach der Untersuchung der Platten ist das Kulturmedium sorgfältig von den Platten zu entfernen. Das ist ein wichtiger Schritt, weil reduzierende Chemikalien im Extrakt auch MTT reduzieren können und dadurch zu falsch negativen Ergebnissen führen. 50 µl der MTT-Lösung (C.2.2.4.3) werden anschließend jeder zu prüfenden Vertiefung zugesetzt und die Platten werden für weitere 2 h im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Anschließend wird die MTT-Lösung dekantiert und 100 µl Isopropanol werden in jede Vertiefung hinzugefügt. Diese Platte wird geschwenkt und anschließend in ein Mikrotiterplatten-Lesegerät überführt, das über ein 570-nm-Filter zum Ablesen des Absorptionsgrads verfügt (Referenz-Wellenlänge 650 nm).

**Tabelle C.1 — Arbeitsablauf der MTT-Zytotoxizitätsprüfung**

<b>ZEIT</b> h	<b>DURCHFÜHRUNG</b>
00:00	Aussaat auf 96er Mikrotiterplatten: $1 \times 10^4$ Zellen/100 µl MEM Kulturmedium/Vertiefung Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /22 h bis 26 h) ↓
24:00	Kulturmedium entfernen ↓
24:00	Mit $\geq 4$ Konzentrationen des Prüfmusterextrakts in Behandlungsmedium (100 µl) behandeln (unbehandelte Blindprobe = Behandlungsmedium) Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /24 h) ↓
48:00	Mikroskopische Beurteilung von morphologischen Veränderungen Entfernen des Kulturmediums Zugabe von 50 µl MTT-Lösung Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /2 h) ↓
51:00	MTT-Lösung entfernen Zugabe von 100 µl Isopropanol in jede Vertiefung Platte schwenken ↓
51:30	Feststellen des Absorptionsgrads bei 570 nm (Referenz-Wellenlänge 650 nm)

#### C.2.4 Datenaufzeichnung

Die erzeugten Daten werden in einer Rohdatendatei aufgezeichnet. Diese Ergebnisse werden in Tabellenform dargestellt und schließen Versuchsgruppen mit dem Prüfgegenstand, Negativkontrollen, Blindprobe und Positivkontrollen ein.

#### C.2.5 Datenanalyse

Eine Abnahme der Anzahl lebender Zellen führt zu einer Abnahme der Stoffwechselaktivität in der Probe. Wie durch die optische Dichte bei 570 nm gezeigt, korreliert diese Abnahme direkt mit der Menge an gebildetem blau-violettem Formazan. Zum Berechnen der Verringerung der Lebensfähigkeit im Vergleich zur Blindprobe wird die folgende Gleichung (C.1) angewendet:

$$\text{Viab.\%} = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}} \quad (\text{C.1})$$

Dabei ist

$OD_{570e}$  der Mittelwert der gemessenen optischen Dichte des 100%igen Extrakts des Prüfmusters;

$OD_{570b}$  der Mittelwert der gemessenen optischen Dichte der Blindproben.

Je kleiner der Viab.%-Wert, umso höher ist das zytotoxische Potenzial des Prüfgegenstandes.

Wenn die Lebensfähigkeit auf  $< 70$  % der Blindprobe reduziert ist, weist der Prüfgegenstand ein zytotoxisches Potenzial auf. Die Lebensfähigkeit bei dem 50%igen Extrakt des Prüfmusters sollte mindestens gleich hoch oder höher sein als bei dem 100%igen Extrakt, andernfalls sollte die Prüfung wiederholt werden.

## Anhang D (informativ)

### Zytotoxizitätsprüfung mit XTT

#### D.1 Allgemeines

Die folgende Prüfvorschrift beruht auf der Messung der Lebensfähigkeit von Zellen über die mitochondriale Dehydrogenase, siehe Literaturhinweis [9].

XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid) wird in lebensfähigen Zellen metabolisch zu einem wasserlöslichen Formazanprodukt reduziert. Die Anzahl lebensfähiger Zellen korreliert mit der durch photometrische Messungen bestimmten Farbintensität.

#### D.2 Versuchsdurchführung

##### D.2.1 Grundlegendes Verfahren

L929-Zellen werden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und als Kultur für 24 h (etwa eine Verdopplungsperiode) gehalten, um einen semikonfluenten einschichtigen Zellrasen zu bilden (siehe Literaturhinweis [5] zu weiteren Informationen bezüglich der Zellerhaltung und der Kultivierungsverfahren). Sie werden anschließend der Prüfverbindung in einem Bereich unterschiedlicher Konzentrationen ausgesetzt. Nach einer Expositionsdauer von 24 h wird die Formazanbildung für jede Behandlungskonzentration bestimmt und mit dem Wert verglichen, der an Kontrollkulturen bestimmt wurde. Für jede Behandlung wird die prozentuale Hemmung des Wachstums berechnet.

##### D.2.2 Material

###### D.2.2.1 Zelllinie

L-929-Zellen (NCTC Klon 929: CCL 1, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA; ECACC Nr. 88102702, European Collection of Cell Cultures (Europäische Sammlung von Zellkulturen), Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK). Zellkulturen müssen frei von Mycoplasmen sein.

###### D.2.2.2 Technische Ausrüstung

**D.2.2.2.1 Brutschrank**, 37 °C, befeuchtet, 5 % CO<sub>2</sub>/Luft

**D.2.2.2.2 Sicherheitswerkbank**, Standard: „Biogefährdung“.

**D.2.2.2.3 Wasserbad**, 37 °C.

**D.2.2.2.4 Umkehrmikroskop mit Phasenkontrast**..

**D.2.2.2.5 Laborbrenner**.

**D.2.2.2.6 Zentrifuge**, wahlweise mit Mikrotiterplattenrotor ausgestattet.

**D.2.2.2.7 Laborwaage**.

# **DIN EN ISO 10993-5:2009-10** **EN ISO 10993-5:2009 (D)**

**D.2.2.2.8 Photometer** mit 450 nm-Filter (Referenz-Wellenlänge 650 nm) für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen.

**D.2.2.2.9 Schüttelgerät** für Mikrotiterplatten.

**D.2.2.2.10 Zellzähler** oder **Hämozytometer**.

**D.2.2.2.11 Pipettierhilfe**.

**D.2.2.2.12 Pipetten, 8-Kanal-Pipetten, Verdünnungsblock**.

**D.2.2.2.13 Kryoröhrchen**.

**D.2.2.2.14 Gewebekulturflaschen** oder **Gewebekultur-Petrischalen**.

**D.2.2.2.15 Gewebekultur-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen**.

## **D.2.2.3 Chemikalien, Medien und Seren**

**D.2.2.3.1 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)**, ohne Phenolrot, ohne Glutamin und ohne  $\text{NaHCO}_3$ .

**D.2.2.3.2 Fetales Kälberserum (FCS)**.

**D.2.2.3.3 Trypsin-/EDTA-Lösung**.

**D.2.2.3.4 Phosphatgepufferte Saline (PBS)**.

**D.2.2.3.5 XTT (2,3-Bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilin, inneres Salz)**.

**D.2.2.3.6 PMS (Phenazinmethosulfat)**.

## **D.2.2.4 Vorbereitungen**

### **D.2.2.4.1 Allgemeines**

Alle Lösungen, Glasgeräte usw. müssen steril sein und alle Verfahren sollten unter aseptischen Bedingungen und in der sterilen Umgebung einer Sicherheitswerkbank (Standard für Biogefährdung) durchgeführt werden.

### **D.2.2.4.2 Medien**

MEM (mit Natriumbicarbonat gepuffert) ergänzt mit (Endkonzentrationen in MEM sind angegeben):

#### **(A) zum Einfrieren**

- 20 % FCS
- 7 % bis 10 % DMSO

#### **(B) für Routinekultur**

- 10 % FCS
- 4 mM Glutamin oder Glutamax
- 100 IE/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

Vollständige Medien sollten bei 4 °C aufbewahrt und nicht länger als zwei Wochen gelagert werden.



#### D.2.2.4.3 XTT/PMS Lösung

XTT wird mit Hilfe eines Schüttelgeräts frisch in 56 °C bis 60 °C heißem MEM ohne Phenolrot in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Mit Spritzenfiltern (Porengröße  $\leq 0,22 \mu\text{m}$ ) wird die Lösung durch Sterilfiltration sterilisiert. PMS (Phenazinmethosulfat) wird als eine Lösung von 5 mM in PBS-Puffer hergestellt und durch ein 0,22  $\mu\text{m}$ -Sterilfilter filtriert.

Die PMS-Lösung wird der XTT-Lösung kurz vor dem Gebrauch in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  (5  $\mu\text{ml}$  einer 5-mM-PMS-Lösung/ml XTT-Lösung) zugesetzt. Die XTT-/PMS-Lösung wird dann unverzüglich den zu prüfenden Vertiefungen zugesetzt.

#### D.2.2.4.4 Herstellung des Probenextrakts

Die Proben werden in Übereinstimmung mit ISO 10993-12 unter Verwendung von MEM ohne Phenolrot und mit FBS extrahiert.

### D.2.3 Verfahren

#### D.2.3.1 Allgemeines

Zu Routineverfahren der Zellkultivierung siehe Anhang C im Literaturhinweis [1].

#### D.2.3.2 Qualitätsüberprüfung des Versuchs (I); Positivkontrolle (PC) und Negativkontrolle (NC)

Positiv- und Negativkontrollen sind in jede Zytotoxizitätsprüfung einzubeziehen. Es werden positive und negative Referenzmaterialien empfohlen, z. B. ZDEC und ZDBC (siehe Fußnote 1 auf Seite 6).

#### D.2.3.3 Qualitätsüberprüfung des Versuchs (II); Blindprobe

Der in der unbehandelten Blindprobe erhaltene Absolutwert der optischen Dichte ( $OD_{450}$ ) zeigt an, ob die je Vertiefung ausgesäten  $1 \times 10^4$  Zellen bei üblicher Verdopplungszeit während der zwei Versuchstage exponentiell gewachsen sind.

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn der Mittelwert der  $OD_{450}$  der Blindproben  $\geq 0,2$  beträgt.

Zur Überprüfung auf systematische Fehler bei der Zellaussaat werden Blindproben sowohl an der linken Seite (Reihe 2) als auch an der rechten Seite (Reihe 11) der 96er Mikrotiterplatte angeordnet (die Reihen 1 und 12 dürfen nicht verwendet werden; zur Probenverteilung auf der Platte siehe Anhang E in [1]).

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn der linke und der rechte Mittelwert der Blindproben um nicht mehr als 15 % vom Mittelwert aller Blindproben abweichen.

Überprüfungen auf Fehler bei der Zellaussaat können auch durch das Untersuchen jeder Platte unter einem Phasenkontrastmikroskop erfolgen, um sicherzustellen, dass die Zellquantität gleichmäßig ist. Durch die mikroskopische Bewertung erübrigt sich die Notwendigkeit von zwei Reihen Blindproben.

#### D.2.3.4 Durchführung der Prüfung

**WICHTIG — Nach dem Auftauen aus dem Vorrat sind die Zellen vor der Verwendung in der Prüfung zwei bis dreimal zu passagieren.**

Tabelle D.1 stellt den Arbeitsablauf des Prüfverfahrens dar.

## DIN EN ISO 10993-5:2009-10

### EN ISO 10993-5:2009 (D)

#### Erster Tag nach dem Heranwachsen der Zellen aus dem gefrorenen Vorrat:

- Die Zellkulturen werden durch enzymatischen Verdau (Trypsin/EDTA) von den Kulturflaschen abgelöst und die Zellsuspension wird zentrifugiert (200 g, 3 min). Die Zellen werden anschließend in Kulturmedium wieder suspendiert und die Zellsuspension wird auf eine Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Mit einer Mehrkanalpipette sind 100 µl reines Kulturmedium (Blindprobe) in die peripheren Vertiefungen einer 96er Gewebekultur-Mikrotiterplatte zu verteilen (= Blindproben, siehe Anhang E im Literaturhinweis [1]). In die verbleibenden Vertiefungen sind 100 µl einer Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen/ml ( $= 1 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung) zu verteilen.
- Die Zellen sind für 24 h zu bebrüten (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, > 90 % Feuchte), damit die Zellen einen semikonfluenten einschichtigen Zellrasen bilden. Diese Bebrütungsdauer stellt die Reaktivierung und das Anhaften der Zellen sowie den Übergang zur exponentiellen Wachstumsphase sicher.
- Jede Platte ist unter einem Phasenkontrastmikroskop zu untersuchen, um sicherzustellen, dass das Zellwachstum relativ gleichmäßig über die Mikrotiterplatte verteilt ist. Diese Überprüfung dient dem Feststellen von Versuchsfehlern.

#### Zweiter Tag

- Nach einer Bebrütungsdauer von 24 h ist Kulturmedium von den Zellen abzusaugen.
- Je Vertiefung sind 100 µl Behandlungsmedium zuzusetzen, das entweder die geeignete Konzentration des Probenextraktes, die Negativkontrolle, die Positivkontrolle oder nichts außer der Blindprobe enthält. Mindestens vier unterschiedliche Konzentrationen des Prüfmusterextrakts oder des Extrakts der Positivkontrolle sollten geprüft werden. Die höchste verwendete Konzentration sollte 100 % Extrakt sein und die anderen Konzentrationen werden innerhalb eines einfach logarithmischen Bereichs entsprechend verteilt sein. Für die Negativkontrolle sollte ausschließlich der 100%ige Extrakt geprüft werden. Kulturmedium sollte als Blindprobe verwendet werden.
- Die Zellen sind für 24 h (bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C, > 90 % Feuchte) zu bebrüten.

#### Dritter Tag

Nach einer Behandlungsdauer von 24 h ist jede Platte unter einem Phasenkontrastmikroskop auf systematische Fehler bei der Zellaussaat und Wachstumseigenschaften der Kontrolle und der behandelten Zellen zu untersuchen. Veränderungen in der Morphologie der Zellen infolge zytotoxischer Wirkungen des Prüfmusterextrakts sind aufzuzeichnen, diese Aufzeichnungen dürfen jedoch nicht für Berechnungen jedes beliebigen quantitativen Maßes der Zytotoxizität verwendet werden. Unerwünschte Wachstumseigenschaften von Kontrollzellen weisen möglicherweise auf einen Versuchsfehler hin und können als Grund dienen, den Versuch zu verwerfen.

Nach der Untersuchung der Platten werden 50 µl der XTT-/PMS-Lösung jeder zu prüfenden Vertiefung zugesetzt und die Platten werden für weitere 3 h bis 5 h im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Die Platten sollten in einer dunklen Umgebung gehalten werden. Anschließend werden die Platten vorsichtig geschwenkt und ein aliquoter Anteil von 100 µl wird aus jeder Vertiefung in die entsprechende Vertiefung einer neuen Platte überführt und diese Platte wird anschließend in ein Mikrotiterplatten-Lesegerät überführt, das über ein 450-nm-Filter zum Ablesen des Absorptionsgrads verfügt (Referenz-Wellenlänge 630 nm).

**Tabelle D.1 — Arbeitsablauf der XTT-Zytotoxizitätsprüfung**

ZEIT h	DURCHFÜHRUNG
00:00	Aussaat auf 96er Mikrotiterplatten: $1 \times 10^4$ Zellen/100 µl MEM Kulturmedium/Vertiefung Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /22 h bis 26 h) ↓
24:00	Kulturmedium entfernen ↓
24:00	Mit $\geq 4$ Konzentrationen des Prüfmusterextrakts in Behandlungsmedium (100 µl) behandeln (unbehandelte Blindprobe = Behandlungsmedium) Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /24 h) ↓
48:00	Mikroskopische Beurteilung von morphologischen Veränderungen Zugabe von 50 µl XTT-/PMS-Lösung Bebrüten (bei 37 °C/5 % CO <sub>2</sub> /3 h bis 5 h) ↓
51:00	Platte schwenken 100 µl von jeder Vertiefung auf eine neue Platte überführen ↓
51:30	Feststellen der Absorption bei 450 nm (Referenz-Wellenlänge 630 nm)

## D.2.4 Datenaufzeichnung

Die erzeugten Daten werden in einer Rohdatendatei aufgezeichnet. Diese Ergebnisse werden in Tabellenform dargestellt und schließen Versuchsgruppen mit dem Prüfgegenstand, Negativkontrollen, Blindprobe und Positivkontrollen ein.

## D.2.5 Datenanalyse

Eine Abnahme der Anzahl lebender Zellen führt zu einer Abnahme der Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenase in der Probe. Wie durch die optische Dichte bei 450 nm gezeigt, korreliert diese Abnahme direkt mit der Menge an gebildetem orangefarbenem Formazan. Zum Berechnen der Verringerung der Lebensfähigkeit im Vergleich zur Blindprobe wird die folgende Gleichung (D.1) angewendet:

$$\text{Viab.}\% = \frac{100 \times OD_{450e}}{OD_{450b}} \quad (\text{D.1})$$

Dabei ist

$OD_{450e}$  der Mittelwert der gemessenen optischen Dichte des 100%igen Extrakts des Prüfmusters;

$OD_{450b}$  der Mittelwert der gemessenen optischen Dichte der Blindproben.

Je kleiner der Viab. %-Wert, umso höher ist das zytotoxische Potenzial des Prüfgegenstandes.

Wenn die Lebensfähigkeit auf  $< 70$  % der Blindprobe reduziert ist, weist der Prüfgegenstand ein zytotoxisches Potenzial auf. Die Lebensfähigkeit bei dem 50%igen Extrakt des Prüfmusters sollte mindestens gleich hoch oder höher sein als bei dem 100%igen Extrakt, andernfalls sollte die Prüfung wiederholt werden.

Anhang ZA  
(informativ)

Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den  
grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 93/42/EWG

Diese Europäische Norm wurde im Rahmen eines Mandates, das dem CEN von der Europäischen Kommission und der Europäischen Freihandelszone erteilt wurde, erarbeitet, um ein Mittel zur Erfüllung der grundlegenden Anforderungen der Richtlinie nach der neuen Konzeption (Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte) bereitzustellen.

Sobald diese Norm im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften im Rahmen der betreffenden Richtlinie in Bezug genommen und in mindestens einem der Mitgliedstaaten als nationale Norm umgesetzt worden ist, berechtigt die Übereinstimmung mit den in Tabelle ZA.1 aufgeführten Abschnitten dieser Norm innerhalb der Grenzen des Anwendungsbereichs dieser Norm zu der Annahme, dass eine Übereinstimmung mit den entsprechenden grundlegenden Anforderungen der Richtlinie und der zugehörigen EFTA-Vorschriften gegeben ist.

Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Richtlinie 93/42/EWG  
über Medizinprodukte

Abschnitte/Unterabschnitte dieser Europäischen Norm	Grundlegende Anforderungen der Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte	Erläuterungen/Anmerkungen
4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	Anhang 1: 7.1, 7.5	

**WARNHINWEIS** — Für Produkte, die in den Anwendungsbereich dieser Norm fallen, können weitere Anforderungen und weitere EG-Richtlinien anwendbar sein.

Anhang ZB  
(informativ)

Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den  
grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 90/385/EWG

Diese Europäische Norm wurde im Rahmen eines Mandates, das dem CEN von der Europäischen Kommission und der Europäischen Freihandelszone erteilt wurde, erarbeitet, um ein Mittel zur Erfüllung der grundlegenden Anforderungen der Richtlinie nach der neuen Konzeption (Richtlinie 90/385/EWG über Aktive implantierbare medizinische Geräte) bereitzustellen.

Sobald diese Norm im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften im Rahmen der betreffenden Richtlinie in Bezug genommen und in mindestens einem der Mitgliedstaaten als nationale Norm umgesetzt worden ist, berechtigt die Übereinstimmung mit den in Tabelle ZB.1 aufgeführten Abschnitten dieser Norm innerhalb der Grenzen des Anwendungsbereichs dieser Norm zu der Annahme, dass eine Übereinstimmung mit den entsprechenden grundlegenden Anforderungen der Richtlinie und der zugehörigen EFTA-Vorschriften gegeben ist.

Tabelle ZB.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Richtlinie 90/385/EWG  
über Aktive implantierbare medizinische Geräte

Abschnitte/Unterabschnitte dieser Europäischen Norm	Grundlegende Anforderungen der Richtlinie 90/385/EWG über Aktive implantierbare medizi- nische Geräte	Erläuterungen/Anmerkungen
4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	Anhang I: 9	

**WARNHINWEIS —** Für Produkte, die in den Anwendungsbereich dieser Norm fallen, können weitere Anforderungen und weitere EG-Richtlinien anwendbar sein.

## Literaturhinweise

- [1] Guidance Document on Using *In Vitro* Data to Estimate *In Vivo* Starting Doses for Acute Toxicity, 2001. NIH Publication No. 01-4500 verfügbar unter ([http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox\\_docs/guidance0801/iv\\_guide.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf) ).
- [2] Guidelines for preclinical biological evaluation of medical materials and devices. MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan) memorandum, JIMURENRAKU Iryokiki-Shinsa, **36**, 2003
- [3] BORENFEUND, E. und PUERNER, J. A.. *Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption*, Toxicological Letters, **24**, S. 119–124, 1985
- [4] United States Pharmacopeia
- [5] COECKE, S., BALLS, M., BOWE, G., DAVIS, J., CSTRANTHALER, G., HARTUNG, T., HAY, R., MERTEN, O., PRICE, A., SCHECTMAN, L., STACEY, G., STOKES, W., Guidance on Good Cell Culture Practice, *A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice*, ATLA, **33**, S. 261–287, 2005
- [6] ISAMA, K., MATSUOKA, A., HAISHIMA, Y. und TSUCHIYA, T.. *Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells*, Mater. Trans., **43**, S. 3155–3159, 2002
- [7] TSUCHIYA, T., *Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials*, J. Biomaterials Applications, **5**, S. 139–157, 1994
- [8] MOSMANN, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, J. Immun. Methods, **65**, S. 55–63, 1983
- [9] SCUDIERO, D. A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., y, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H., CURRENS, M. J., SENIFF, D., BOYD, M. R., *Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines*, Cancer Res., **48**, S. 4827–33, 1988
- [10] SPIELMANN, H. et al., *Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany*, Toxicol. In Vitro, **5**, S. 539-542, 1991
- [11] HEXIG, B., NAKAOKA, R. und TSUCHIYA, T. Safety evaluation of surgical materials by cytotoxicity testing. *J. Artif. Organs*, **11**, S. 204-211, 2008