



NaturaPura Ibérica  
Rua das Australias, No. 1  
4705-322 Braga  
Portugali

Elokuu 10, 2009

## **VIITATEN: *IN VITRO* IHOÄRSYTTÄVYYSTESTAUSRAPORTTI**

Oheisena NaturaPuran toimittaman 100% puuvillakangasmateriaalin *in vitro* ihoärsyttävyydestaustuksen testausraportti.

Testi tehtiin käyttäen Skinethic'n ihmisen epidermiskudosmallia testaus suunnitelman mukaisesti ja GLP:tä noudattaen.

Testin tulokset osoittavat, että materiaali ei ole ihmisen ihoa ärsyttävä.

Markus Soimasuo  
CSO, Ph.D, Adj. Professor, European Registered Toxicologist  
Histola Research Oy  
Niittyhaankatu 20  
33720 Tampere

puhelin +358 20 743 2005  
email markus.soimasuo@histola.fi

## Testausraportti

### Orgaanisen puuvillakankaan *in vitro* ihoärsyttävyydestaus

Pvm: 10.8.2009

Kirjoittaja: Ya-Hua Zhuang, Histola Research Oy

Sponsori: NaturaPura Ibérica

#### JOHDANTO

Kuten testaussuunnitelmassa on kuvattu, ihoärsyttävyyden *in vitro*-testaus on nopea ja edullinen keino tutkia kankaan mahdollisia ärsyttäviä ominaisuuksia. Testauksen kuvaus, tulokset ja tulkinta perustuvat kemiallisten aineiden akuuttiin ärsyttävyydestiin, kuten testaussuunnitelmassa on kuvattu.

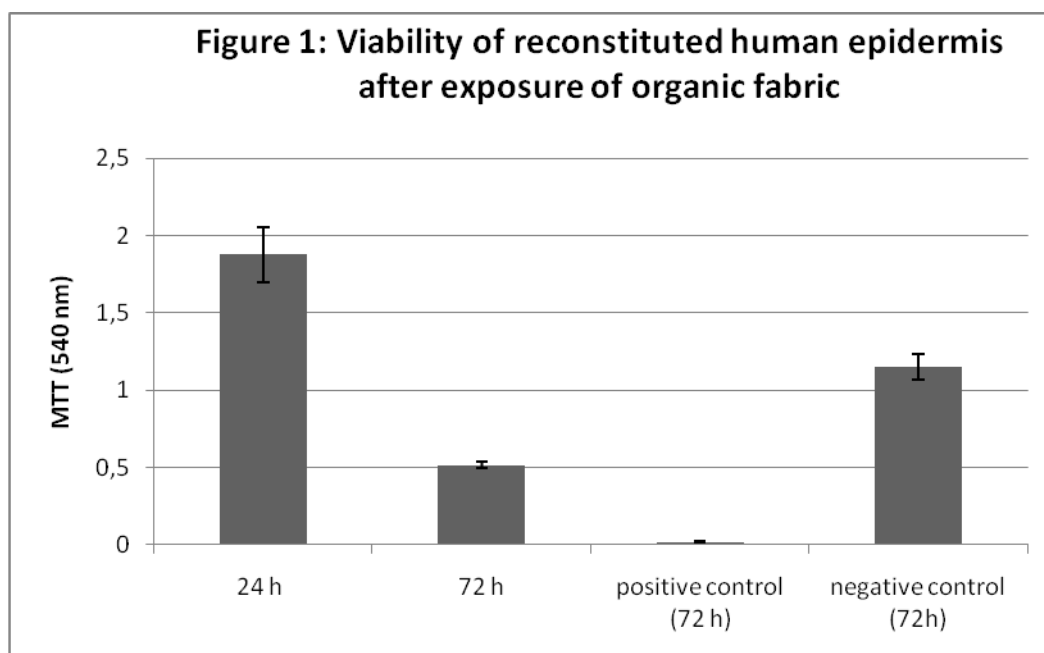
#### TESTAUKSEN KUVAUS

1. 12 kpl RHE-kudoksia (RHE/S/17. eränro: 09 022A 0704) esi-inkuboitiin SkinEthic<sup>®</sup>n kasvatusmediumissa (eränro: 0907 011J 440) yön yli.
2. Testiartikkeli (0.5 cm<sup>2</sup>) ja kontrollinäytteet laitettiin kudosten päälle. Kolme kudosta käytettiin yhden päivän testiin ja kolme kolmen päivän testiin. Negatiiviseksi kontrolliksi laitettiin Dulbecon fosfaattipuskuroitua salinia (DPBS, 16 µl) kudosten päälle, ja sen päälle aseteltiin pala nylonverkkoa (0.5 cm<sup>2</sup>, tunnetusti ei-ärsyttävä). Positiiviseksi kontrolliksi laitettiin 0.8% natriumdodekyylisulfaattia (SDS, Sigma L4509, tunnetusti ärsyttävä) ja samanlainen nylonverkko kuin negatiivisessa kontrollissa. Ennen testiartikkelin laittamista kudoksen päälle testiartikkeli kasteltiin viljelymediumissa. Kolme kudosta (inserttiä) käytettiin kuhunkin aikapisteeseen ja kontrolleiksi. Niistä kaksi käytettiin solujen elävyydestestaukseen (MTT) ja yhdestä tehtiin histologinen tutkimus. Kontrolleja altistettiin 72 tunnin aikapisteeseen asti.
3. Kudoksia inkuboitiin viljelymediumissa soluviljelykaapissa (kosteutetussa ympäristössä, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> ja 95% ilma, yhden päivän ja kolmen päivän ajan).
4. Inkubointiajan lopulla kudokset pestiin DPBS:llä ja siirrettiin 24-kuoppalevyille.
5. Sitten kudoksia inkuboitiin 300 µl:ssa MTT:tä (1 mg/ml, laimennettu Skinethic<sup>®</sup>n ylläpitomediumiin, eränro 0907 011J 439) kolmen tunnin ajan (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> ja 95% ilma, kosteutettu ympäristö).

6. Inkuboinnin lopulla kudokset siirrettiin uudelle 24-kuoppalevyille, johon oli jo pipetoitu 800  $\mu$ l isopropanolia per kaivo, ja sen jälkeen lisättiin vielä 700  $\mu$ l isopropanolia kudosten päälle (insertin sisälle), ja inkuboitiin kaksi tuntia huoneen lämmössä varovaisesti ravistellen (150 rpm).
7. Inkuboinnin loputtua pipetoitiin 96-kuoppalevyille 3 x 200  $\mu$ l uuttoliuosta per kaivo (= 3 kaivoa per kudokseksi eli 2 rinnakkaista per kudokseksi). Isopropanolia käytettiin taustakontrollina.
8. Isopropanoliuuton optinen tiheys (OD) luettiin 96-kuoppalevyspektrofotometrillä (Hidex Chameleon V monilevylukija) aallonpituudella 540 nm.
9. Mittausdata tallennettiin ja tulostettiin MicroWin 2000:n avulla.
10. Histologista tutkimusta varten kudokset fiksoitiin 4% formaliiniin. Näytteistä tehtiin parafiinileikkeet rutiinimentelmän avulla. 5  $\mu$ m paksut parafiinileikkeet dehydroitiin ja värjättiin hematoksyliini-eosiinilla (HE). Kudosten histologinen tarkastelu tehtiin mikroskoopilla (Olympus BX60).

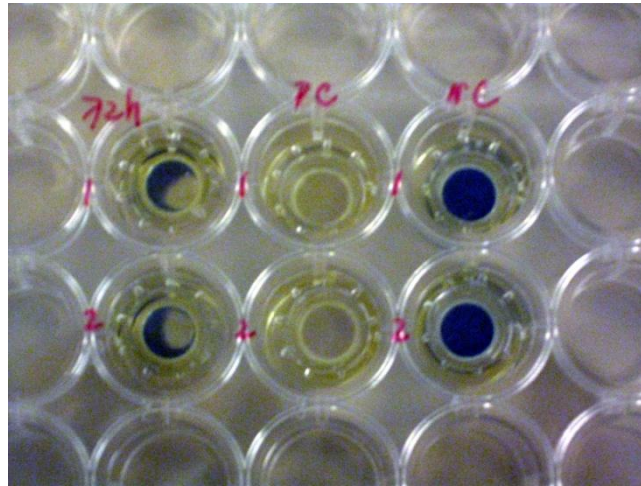
## TULOKSET JA POHDINTA

Kuvassa 1 on esitetty MTT:llä mitatun solujen elävyyden tulokset. Kuvasta voidaan nähdä, että MTT mittaustulos 24 tunnin jälkeen on huomattavasti korkeampi kuin mittaustulos 72 tunnin jälkeen sekä positiivisen kontrollin tulos, ja jopa korkeampi kuin negatiivisen kontrollin tulos 72 tunnin jälkeen. Tämä viittaisi siihen, ettei testiartikkeli ole ärsyttävä ko. aikapisteessä.



MTT:n mittaustulos 72 tunnin jälkeen on matalampi kuin negatiivisen kontrollin tulos, viitaten siihen, että jostain syystä testiartikkeli olisi ko. aikapisteessä ärsyttävä. Kuitenkin,

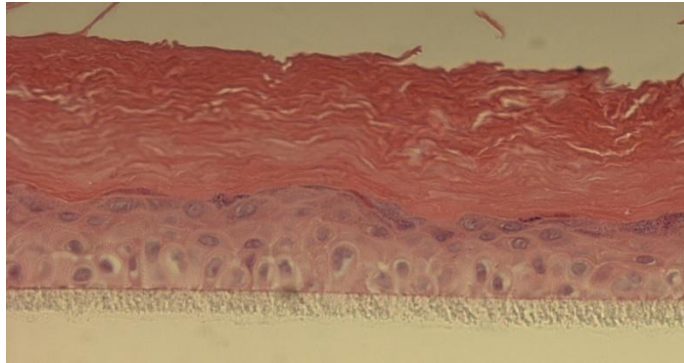
kun tutkittiin tarkemmin MTT:n värjäytymää, nähtiin, ettei se pidä paikkaansa. Kuvasta 2 voidaan nähdä, että kudokset, joita oli altistettu testiartikkelille 72 tunnin ajan (kaksi vasemmanpuoleista inserttiä) olivat vain osittain värjäytyneet MTT:llä.



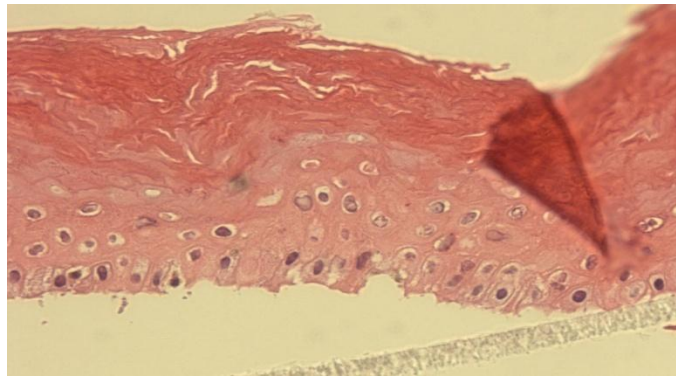
Kuva 2. Testiartikkelille 72 tuntia altistettujen kudosten MTT-värjäytymät

Lähes puolet kudoksesta ei ollut lainkaan värjäytynyt (verrattavissa positiiviseen kontrolliin, PC) osoittaen sen, että kudoksesta oli kuollut. Tarkkaa syytä ilmiölle ei tiedetä. Kuitenkin, kun kaksi kudosta käyttäytyi täysin samanlailla, ei voi olla kyseessä ilmakupla tai muu työn suorituksesta johtuva virhe. Uskottavin selitys tähän on se, että suhteellisen paksu kangasnäyte esti ilman tai hapen esteettömän pääsyn kudoksiin, aiheuttaen kudosten osittaisen kuoleman. Vastaavaa ilmiötä ei tapahtunut negatiivisessa kontrollissa, koska siinä käytettiin paljon ohuempaa nylonmateriaalia. Niissä osissa kudoksista, jotka värjäytyivät MTT:llä, värin intensiteetti on lähes sama kuin negatiivisessa kontrollissakin osoittaen sen, että kun kudoksesta saa tarpeeksi ilmaa tai happea, sen elävyys on yhtä hyvä kuin negatiivisessa kontrollissa. Tästä johtuen kuvassa 2 näkyvä värjäytymä osoittaa että testiartikkeli ei ole ärsyttävä 72 tunnin altistuksen jälkeen.

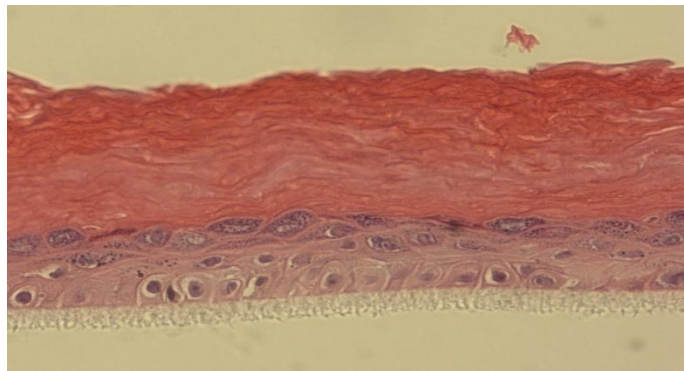
Kuvissa 3A, 3B, 3C ja 3D on esitetty testiartikkelille altistettujen kudosten ja kontrollikudosten histologinen tarkastelu. Histologian tulokset vahvistavat MTT-testauksessa saadut tulokset. 24 tunnin altistuksen jälkeen epidermisen histologinen rakenne ja solurakenne (Kuva 3A) ovat lähes samanlaiset kuin negatiivisessa kontrollissa (Kuva 3C). 72 tunnin altistuksen jälkeen (Kuva 3B), solujen hajoamista oli havaittavissa. Positiivisessa kontrollissa (Kuva 3D), ei ollut havaittavissa juuri lainkaan eläviä soluja.



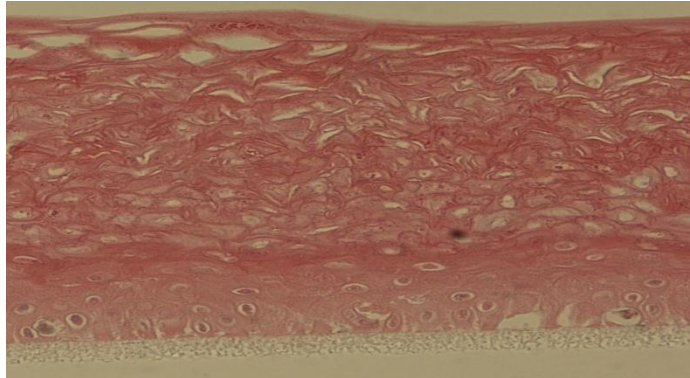
Kuva 3A: ihmisen epidermiskudosmalli, altistettuna testiartikkelille 24 h ajan.



Kuva 3B: ihmisen epidermiskudosmalli, altistettuna testiartikkelille 72h ajan.



Kuva 3C: ihmisen epidermiskudosmalli, negatiivinen kontrolli (DPBS).



Kuva 3D: ihmisen epidermiskudosmalli, positiivinen kontrolli (0.8% SDS).

## JOHTOPÄÄTÖKSET

NaturaPuran toimittama 100% orgaaninen puuvillakangas ei ole ihmisen ihoa ärsyttävä Skinethic<sup>®</sup> n ihmisen epidermiskudosmallitestillä testattuna.

## VIITTEET

1. Skinethic skin irritation test<sup>-42bis</sup> Standard Operating Procedure (SOP). SkinEthic Laboratories, January 2009, INVITTOX Version 1.0
2. A. de Brugerolle de Fraissinette et al: Productivity of an *in vitro* model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles. Cell Biology and Toxicology, 1999; 15: 121-135