



**Universitätsklinikum
Jena**

Klinik für Hautkrankheiten

Qualitäts-zertifiziert nach DIN EN ISO 9001:2008

Universitätsklinikum Jena · Klinik für Hautkrankheiten · Erfurter Str. 35 · 07743 Jena

smartfiber AG

Anita Varga

Breitscheidstraße 154

D-07407 Rudolstadt

Erfurter Straße 35
07743 Jena

Direktor: Prof. Dr. med. P. Elsner

**Labor für In-vitro-Forschung und
Routinediagnostik**

Laborleiter:

PD Dr. Uta-Christina Hipler

Telefon 03641 93 73 31

Telefax 03641 93 74 37

Ansprechpartner:

Dr. Cornelia Wiegand

Telefon 03641 93 75 84

Telefax 03641 93 74 37

web: [http:// www.derma.uni-jena.de](http://www.derma.uni-jena.de)

23. Juli 2015

Studienbericht:

Untersuchung der antioxidativen Wirksamkeit von den Textilproben

15 07 067, # 15 07 068 und # 15 07 069

in vitro

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 00

Internet: www.uniklinikum-jena.de

Gerichtsstand Jena

Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt-IdNr. DE 150545777

Bankverbindung:

Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts

als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deufel

Medizinischer Vorstand und Sprecher des Klinikumsvorstandes:

Prof. Dr. Klaus Höffken

Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf

Kaufmännischer Vorstand: Dr. Brunhilde Seidel-Kwem

Index

	Seite
1. Qualitätszertifikat	3
2. Generelles	
2.1 Proben	4
2.2 Referenzmaterial	4
2.3 Auftraggeber	4
2.4 Prüfeinrichtung	4
2.5 Durchführungszeitraum	4
3. GLP und Qualitätssicherung	5
4. Zusammenfassung	5
5. Hintergrund	6
6. Material und Methoden	
6.1 Vorbereitung der Proben	7
6.2 Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Probe mittels ROS-Test	7
6.3 Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Probe mittels RNS-Test	8
6.4 Statistik	8
7. Abweichungen vom Studienprotokoll	9
8. Dokumentation	9
9. Ergebnisse und Diskussion	10
10. Appendix	
10.1 Abkürzungsverzeichnis	11
10.2 Tabellen und Abbildungen	12
10.3 Literatur	13
10.4 Messdaten	14



1. Qualitätszertifikat



Zertifikat

QUALITÄTSMANAGEMENTSYSTEM – DIN EN ISO 9001: 2008

Hiermit wird bestätigt, dass das

Universitätsklinikum Jena
Klinik für Hautkrankheiten
Erfurter Straße 35
07740 Jena
Deutschland

Inhaber des Zertifikates Nr. FS 519135/5409D

ein Qualitätsmanagementsystem gemäß DIN EN ISO 9001:2008 für den folgenden Geltungsbereich anwendet:

Dermatologie, Allergologie, Berufsdematologie, Andrologie, Dermato-
Histologie, Demato-Onkologie, Hautphysiologie/Skin Study Center,
Forschungslabor, Diagnostisches Labor, Operative Dermatologie, Laser,
Photodermatologie, Proktologie, Phlebologie, Wundheilung,
Trichologie, Venerologie, Kinderdermatologie

Für und im Namen von BSI:

Geschäftsführer, BSI Group Deutschland GmbH

Ursprünglich zertifiziert: 12.12.2003 Letzte Ausgabe: 10.10.2012

Ablaufdatum: 16.10.2015

Seite: 1 von 1



Dieses Zertifikat wurde elektronisch erstellt und bleibt Eigentum der BSI und ist an die Vertragsbedingungen gebunden.
Ein elektronisches Zertifikat kann online bestätigt werden.
Kopien können auf www.bsigroup.de/de/Audit-und-Zertifizierung/Kundenverzeichnis oder per Telefon +49 (0)89 222209-200 bestätigt werden.
Information und Kontakt: BSI (EMEA) Zentrale: 389 Chiswick High Road, London, W4 4AL, United Kingdom.
Ein Mitglied der BSI Unternehmensgruppe.





2. Generelles

2.1 Proben

Textilprobe # 15 07 067

Textilprobe # 15 07 068

Textilprobe # 15 07 069

2.2 Referenzmaterial

-

2.3 Auftraggeber

smartfiber AG

Breitscheidstraße 154

D-07407 Rudolstadt

Ansprechpartner: Anita Varga

2.4 Prüfeinrichtung

Klinik für Hautkrankheiten

Universitätsklinikum Jena

Erfurter Straße 35

D-07740 Jena

Studienleiter: PD Dr. Uta-Christina Hipler

2.5 Durchführungszeitraum

Start: 16.07.2015

Ende: 22.07.2015

Fälligkeit des Berichts: 23.07.2015



3. GLP und Qualitätssicherung

Ich versichere, dass die Prüfeinrichtung entsprechend der "Principles of Good Laboratory Practice" arbeitet und technisch validierte Standard Operating Procedures für die beschriebenen Testmethoden vorliegen. Die Prüfeinrichtung ist nach DIN EN ISO 9001:2008 zertifiziert.

PD Dr. U.-C. Hipler

Laborleiterin

Klinik für Hautkrankheiten

Erfurter Str. 35, D-07740 Jena

Tel.: 03641 / 9-37355

Christina.Hipler@med.uni-jena.de

23.07.2015

Datum

Studienleiter: PD Dr. Uta-Christina Hipler

4. Zusammenfassung

Das Ziel der Studie war die Untersuchung der antioxidativen Kapazität gegen freie Radikale (ROS – reactive oxygen species, RNS – reactive nitrogen species) *in vitro*.

Es wurde gefunden, dass die Textilproben # 15 07 067, # 15 07 068 und # 15 07 069 eine antioxidative Kapazität gegenüber ROS und RNS *in vitro* aufweisen. Das antioxidative Potential der Textilproben # 15 07 068 und # 15 07 069 war vergleichbar und deutlich höher als die Wirksamkeit der Textilprobe # 15 07 067.



5. Hintergrund

Die Haut stellt die Schnittstelle zwischen unserem Körper und der Umwelt dar. Sie ist funktionell das vielseitigste Organ des menschlichen Organismus und erfüllt unterschiedliche Aufgaben. Sie dient der Abgrenzung nach Außen, dem Erhalt der Homöostase, dem Schutz vor Umwelteinflüssen und ist an Stoffwechselprozessen und immunologischen Vorgängen beteiligt. Oxidativer Stress durch freie Radikale (ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species) beschleunigt die Hautalterung und wurde in Zusammenhang mit Hauterkrankungen wie z.B. Atopischer Dermatitis gebracht [Sezer et al. 2007, Briganti & Picardo 2003]. Da UV-Licht die Generierung von freien Radikalen in den Zellen verstärkt, wird der Einsatz von topischen Antioxidantien empfohlen [Masaki 2010, Maela-Azulay & Bagatin 2009]. Darüber hinaus hat unsere Kleidung den längsten und engsten Kontakt mit unserer Haut. Im klinischen und kosmetischen Bereich werden daher Textilien bereits in vielfältiger Weise genutzt. Ein Anwendungsgebiet ist z.B. die Verknüpfung von Antioxidantien und Textilien.

Die antioxidative Kapazität (AOC, antioxidant capacity) von löslichen Substanzen und anderen Materialien, wie z.B. Textilien, kann mittels *in vitro* Tests erfasst und quantifiziert werden. Die verschiedenen Methoden beruhen auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen und verwenden unterschiedliche Radikale und Substrate. Peroxylradikale (ROO^{\cdot}) sind die am häufigsten verwendeten Radikale in *in-vitro*-Verfahren, da sie einerseits das Schlüssel-Radikal für die Autoxidation (Lipid Peroxidation) darstellen [Ou et al. 2001]. So erfasst der ROS-(reactive oxygen species)-Test die Inhibierung der Oxidation von Pholasin[®] durch Superoxidanionen und anderen Sauerstoffradikalen. Demgegenüber misst der RNS-(reactive nitrogen species)-Test die Wirksamkeit eines Antioxidans, die Oxidation von Pholasin[®] durch Peroxynitrit (ONOO^{\cdot}) zu hemmen. Pholasin[®] ist ein Photoprotein der Bohrmuschel *Pholas dactylus*, das nach Oxidation in der Lage ist, Licht zu emittieren (Chemilumineszenz). Diese Eigenschaften konnten bereits in vielfältiger Weise genutzt werden, um die antioxidative Wirksamkeit von Wundverbänden [Wiegand et al. 2009, Wiegand et al. 2006, Schönfelder et al. 2005] und Textilien [Hipler & Wiegand 2011, Wiegand et al. 2010, Fluhr et al. 2010] nachzuweisen.



6. Material und Methoden

6.1 Vorbereitung der Proben

Für die Untersuchung der antioxidativen Kapazität wurden aus den zu testenden Stoffproben mittels 8 mm und 5 mm Biopsie-Stanzen (Stiefel Laboratorium GmbH, Germany) Stücke einheitlicher Größe (0,5 cm² bzw. 0,25 cm²) ausgestanzt und in weiße 96-Well-Mikrotiterplatten (greiner bio-one, Germany) überführt.

6.2 Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Proben mittels ROS-Test

Die Bestimmung der antioxidativen Wirkung gegenüber freien Radikalen, wie dem Superoxidanion (reactive oxygen species, ROS), erfolgte mit dem ABEL[®] Antioxidant Test Kit mit Pholasin[®] für Superoxid und andere freie Radikale (Knight Scientific Limited, UK). Superoxid wird im Test aus den Lösungen A und B freigesetzt. Die zu testenden Stoffproben in der 96-Well-Mikrotiterplatte wurden mit 25 µL Puffer (Lot. GA251A B1 120809) und 100 µL Lösung A (Lot. JA511A A1 130422) versetzt. Anschließend wurden 50 µL Pholasin-Lösung (Lot. AA171A B3 150309) pro Well zugegeben. Nach automatischer Injektion von 25 µL Lösung B (Lot. KA611A B3 110912) erfolgte die Messung der Chemolumineszenz im Mikroplattenluminometer LUMIstar Galaxy (BMG LabTechnologies GmbH, Germany). Die antioxidative Wirkung einer Substanz wird als prozentuale Reduzierung der Peakintensität im Vergleich zu den Kontrollen ohne Probe ausgedrückt.

$$\% \text{ Inhibierung} = \frac{[(\text{peak-Kontrolle}) - (\text{peak-Probe})] \times 100}{(\text{peak-Kontrolle})}$$



6.3 Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Proben mittels RNS-Test

Die Bestimmung der antioxidativen Wirkung gegenüber Peroxynitrit (reactive nitrogen species, RNS) erfolgte mit dem ABEL[®] Antioxidant Test Kit mit Pholasin[®] für Peroxynitrit (Knight Scientific Limited, UK). Peroxynitrit entsteht während der Reaktion von Superoxid mit Stickstoffoxid. Die beiden Reaktanden werden aus einer 2,5 mM SIN-1-Lösung (3-Morpholino-sydnominin HCl) freigesetzt. Die zu testenden Stoffproben in der 96-Well-Mikrotiterplatte wurden mit 100 µL Puffer (Lot. TA 508A B2 120418) versetzt und 50 µL Pholasin-Lösung (Lot. AA 171A A2 130520) pro Well zugegeben. Nach automatischer Injektion von 50 µL SIN-1-Lösung (Lot. UB712B 130820) erfolgte die Messung der Chemolumineszenz im Mikroplattenluminometer LUMIstar Galaxy (BMG LabTechnologies GmbH, Deutschland).

Die antioxidative Wirkung einer Substanz wird als prozentuale Reduzierung der Peakintensität im Vergleich zu den Kontrollen ohne Probe ausgedrückt.

$$\% \text{ Inhibierung} = \frac{[(\text{peak-Kontrolle}) - (\text{peak-Probe})] \times 100}{(\text{peak-Kontrolle})}$$

6.4 Statistik

Alle Versuche wurden in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die einzelnen Messungen erfolgen in Dreifachbestimmungen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgte auf der Basis des Students-T-Test (Microsoft[®] Excel SP2). Als statistisch signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ bewertet. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden durch Sternsymbolik gekennzeichnet: [***] $p \leq 0,001$; [**] $p \leq 0,01$; [*] $p \leq 0,05$.



7. Abweichungen vom Studienprotokoll

Es gab keine Abweichungen vom Studienprotokoll.

8. Dokumentation

Entsprechend der GLP vorschritten werden die folgenden Akten und Daten im Archiv der Klinik für Hautkrankheiten am Universitätsklinikum Jena aufbewahrt:

Eine Kopie des Studienberichtes und das Studienprotokoll sowie die Rohdaten, die während der Studie generiert wurden, werden mindestens für 4 Jahre nach Abschluss der Studie aufbewahrt.

Nicht verwendete Proben und Referenzmaterialien werden mindestens für 12 Monate nach Abschluss de Studie aufbewahrt und danach vernichtet. Materialien und Proben, die über diesen Zeitraum nicht stabil sind, können vor diesem Zeitpunkt ohne die vorherige Zustimmung des Auftraggebers vernichtet werden.

Unterlagen und Berichte zu Wartung und Kalibrierung von Geräten, Validierungen für rechnergestützte Systeme und die Akten der Operating Procedures (SOPs) werden entsprechend der behördlichen Vorschriften aufbewahrt.



9. Ergebnisse und Diskussion

Die Textilproben # 15 07 067, # 15 07 068 und # 15 07 069 waren in der Lage die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Prüflingsgröße von 0,5 cm² signifikant zu inhibieren (Abbildung 1). In der Prüflingsgröße von 0,25 cm² wiesen nur die Textilproben # 15 07 068 und # 15 07 069 eine Inhibition der ROS-Bildung auf, Textilprobe # 15 07 067 zeigte keine Wirksamkeit. Darüber hinaus wurde für die Textilproben # 15 07 067, # 15 07 068 und # 15 07 069 ein Einfluss auf die Bildung von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) beobachtet (Abbildung 2). Die antioxidative Kapazität der Textilproben # 15 07 068 und # 15 07 069 war vergleichbar und deutlich höher als die Aktivität der Textilprobe # 15 07 067.

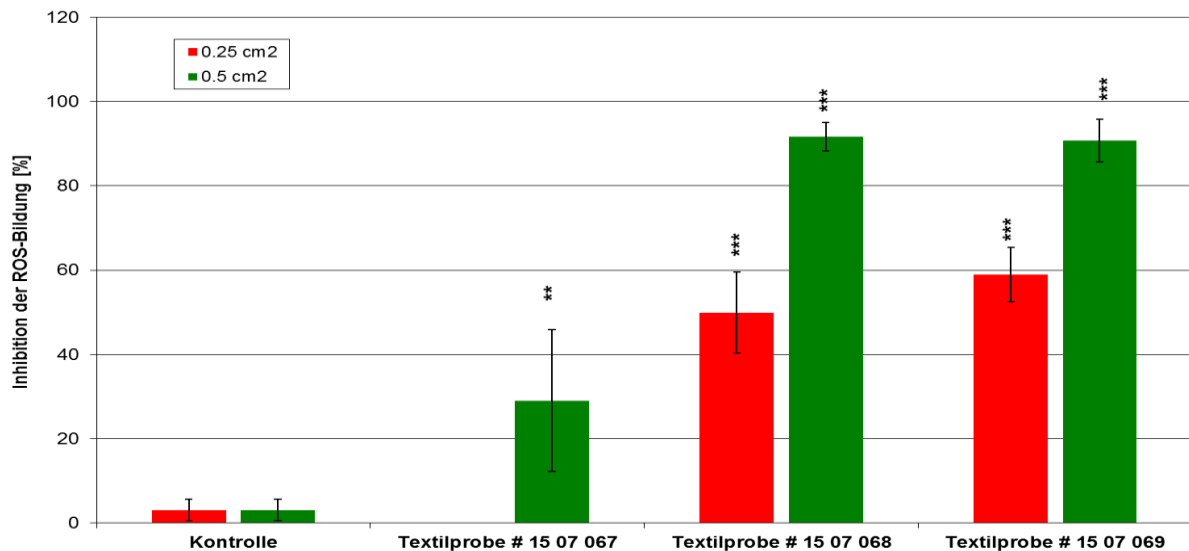


Abbildung 1: Inhibition der ROS-Bildung (Messdaten siehe Tabelle 1 im Appendix).

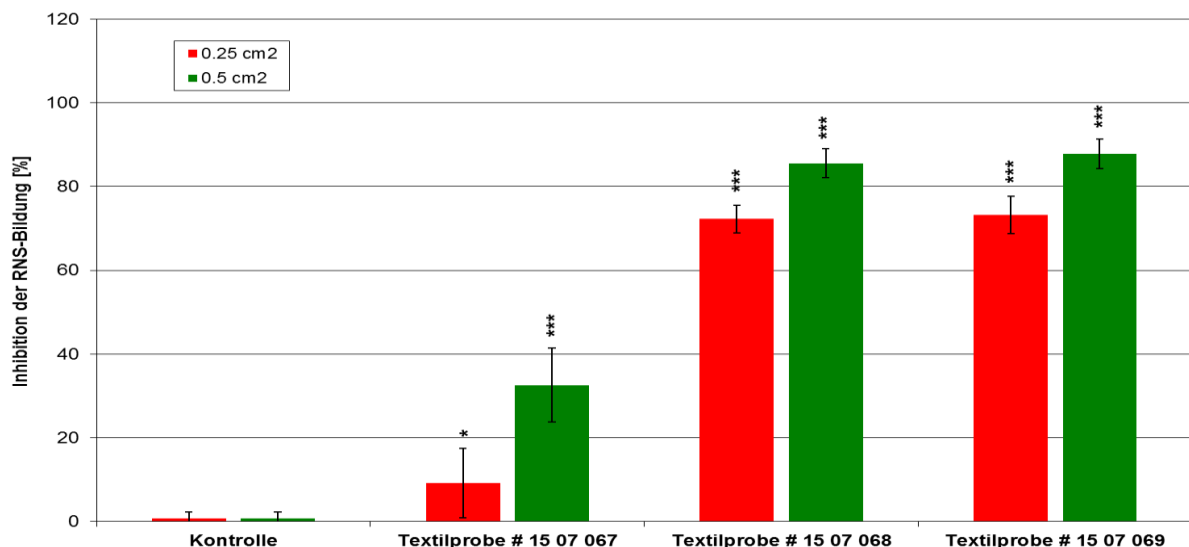


Abbildung 2: Inhibition der RNS-Bildung (Messdaten siehe Tabelle 2 im Appendix).

CONFIDENTIAL – VERTRAULICH

Studienbericht

Untersuchung der antioxidativen Wirksamkeit von den Textilproben # 15 07 067, # 15 07 068 und # 15 07 069 *in vitro*



10. Appendix

10.1 Abkürzungsverzeichnis

cm ²	Quadratcentimeter
M	Molar
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SD	Standardabweichung



10.2 Tabellen und Abbildungen

	Seite
Abbildung 1: Inhibition der ROS-Bildung (Messdaten siehe Tabelle 1 im Appendix).	10
Abbildung 2: Inhibition der RNS-Bildung (Messdaten siehe Tabelle 2 im Appendix).	10
Tabelle 1: Inhibition der ROS-Bildung.	14
Tabelle 2: Inhibition der RNS-Bildung.	15



10.3 Literatur

Briganti S, Picardo M. JEADV 2003; 17:663-9

Fluhr JW, Breternitz M, Kowatzki D, Bauer A, Bossert J, Elsner P, Hipler UC. Exp Dermatol 2010; 19:e9-15

Manela-Azulay M, Bagatin E. Clinics Dermatol 2009; 27:469-474

Masaki H. J Dermatol Sci 2010; 58:85-90

Ou BX, Hampsch-Woodill M, Prior RL. J Agricultur Food Chem 2001; 49:4619-26

Schönfelder U, Abel M, Wiegand C, Klemm D, Elsner P, Hipler U-C. Biomaterials 2005; 26: 6664-6673

Sezer E, Ozugurlu F, Ozyurt H, Sahin S, Etikan I. Clin Exp Dermatol 2007; 32:430-4

Wiegand C, Elsner P, Hipler UC, Klemm D. Cellulose 2006; 13:689-696

Wiegand C, Heinze T, Hipler UC. Wound Rep Reg 2009; 17:511-521

Wiegand C, Fluhr JW, Elsner P, Hipler UC. in Cellulose: Structure and properties, derivatives and industrial uses, eds. A. Lejeune & T. Deprez, Nova Science Publishers, 2010



10.4 Messdaten

Tabelle 1: Inhibition der ROS-Bildung.

	Probengröße	0,25 cm ²	0,5 cm ²
Kontrolle	[%]	0,00	0,00
		3,08	3,08
		5,59	5,59
		0,00	0,00
		4,68	4,68
		5,20	5,20
		Mittelwert	3,1
	SD	2,5	2,5
Textilprobe # 15 07 067	[%]	0,00	18,10
		0,00	10,04
		0,00	48,13
		0,00	14,84
		0,00	47,03
		0,00	36,26
		Mittelwert	0,0
	SD	0,0	16,9
	p-Wert (Kontrolle)	0,0139	0,0039
Textilprobe # 15 07 068	[%]	48,04	93,83
		40,31	91,60
		38,10	85,41
		59,10	94,64
		52,92	93,66
		61,26	90,55
		Mittelwert	50,0
	SD	9,6	3,4
	p-Wert (Kontrolle)	0,0001	0,0001
Textilprobe # 15 07 069	[%]	55,42	95,72
		49,72	91,28
		56,30	89,07
		67,43	96,83
		64,28	88,51
		60,31	83,21
		Mittelwert	58,9
	SD	6,4	5,0
	p-Wert (Kontrolle)	0,0001	0,0001


Tabelle 2: Inhibition der RNS-Bildung.

	Probengröße	0,25 cm ²	0,5 cm ²
Kontrolle	[%]	0,00	0,00
		0,00	0,00
		3,80	3,80
		0,00	0,00
		0,83	0,83
		0,00	0,00
	Mittelwert	0,8	0,8
	SD	1,5	1,5
Textilprobe # 15 07 067	[%]	19,36	29,39
		19,33	18,02
		8,21	41,88
		5,43	40,05
		0,00	36,69
		2,64	29,45
	Mittelwert	9,2	32,6
	SD	8,4	8,8
	p-Wert (Kontrolle)	0,0360	0,0001
Textilprobe # 15 07 068	[%]	68,92	85,88
		75,22	89,89
		76,48	84,93
		73,20	88,11
		71,20	79,86
		68,46	84,71
	Mittelwert	72,2	85,6
	SD	3,3	3,4
	p-Wert (Kontrolle)	0,0001	0,0001
Textilprobe # 15 07 069	[%]	79,19	90,82
		75,18	89,14
		76,95	91,31
		70,15	87,49
		67,80	86,48
		70,47	81,77
	Mittelwert	73,3	87,8
	SD	4,5	3,5
	p-Wert (Kontrolle)	0,0001	0,0001