

Valutazione *in vitro* del potenziale irritante su epitelio vaginale umano ricostruito

In vitro evaluation of the irritant potential on human reconstituted vaginal epithelium

Agorà pharma

Edonelle intense

Protocollo n° / *Report no.* **2018I14V-1**

Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Elia REGOLA, Riccardo VICINI	INDICE INDEX
Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità <i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i> Dr. Claudio ANGELINETTA Laurea in Chimica (Università degli Studi di Milano); Specializzato in Scienza e Tecnologia Cosmetiche (Università degli Studi di Milano) Direttore Tecnico BIO BASIC EUROPE S.r.l.	Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3
Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab <i>Project Responsible Bio Basic Lab</i> Dr.ssa Elia REGOLA Laurea in Scienze Biologiche (Università degli Studi di Genova); Dottorato di Ricerca in Medicina e Biologia Sperimentale - indirizzo Biochimica (Università degli Studi di Genova); Specializzata in Microbiologia e Virologia - indirizzo Tecnico (Università degli Studi di Genova)	Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4
Responsabile Laboratorio Test in vitro Bio Basic Europe <i>In vitro Tests Responsible Bio Basic Europe</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Scopo <i>Aim</i> pag. 6
Sperimentatore Bio Basic Lab e Responsabile della Relazione <i>Bio Basic Lab Experimenter and Person responsible for the report</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 7
	Risultati <i>Results</i> pag. 10
	Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 12
	Bibliografia <i>References</i> pag. 13

Tutti i diritti sono riservati. Trattasi di documento tecnico scientifico protetto da Copyright.
Nessuna parte di esso può essere riprodotta in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta di Bio Basic Europe S.r.l.
In base alla nostra esperienza si consiglia di verificarne ogni 3 anni l'armonizzazione con eventuali aggiornamenti normativi.

*All rights are reserved. This is a scientific technical document protected from Copyright.
No part of it can be reproduced in any way without the preventive authorization written of Bio Basic Europe S.r.l.
According to our experience we advice to check every 3 years its compliance with the guidelines in force*



RIASSUNTO

Per studiare la potenziale azione irritante sull'epitelio vaginale del prodotto testato, il campione è stato applicato su epitelio umano vaginale ricostruito e successivamente è stata valutata la vitalità cellulare mediante test MTT. La riduzione della vitalità cellulare dei tessuti trattati con il campione in esame rispetto al controllo negativo viene utilizzata per predire il potenziale irritante.

A questo scopo 3 tessuti sono stati trattati con il prodotto testato e 3 sono stati trattati con SDS 5% (controllo positivo). Come controllo negativo sono stati usati 3 tessuti non trattati (mantenuti in D-PBS durante il periodo di incubazione). Il campione testato viene considerato irritante per l'epitelio vaginale se la vitalità cellulare dei tessuti in seguito a trattamento è $\leq 60\%$.

Dai risultati del test MTT è emerso che la vitalità dei tessuti trattati con il campione testato è pari a **105.9%**, dimostrando che **il prodotto non è irritante per l'epitelio vaginale**

ABSTRACT

To assess the potential irritation on the vaginal epithelium the sample was applied on reconstructed human vaginal epithelium and then cell viability was assessed through a MTT test. The reduction of the viability of tissues exposed to the sample in comparison to negative controls is used to predict the vaginal epithelium irritation potential.

For this purpose 3 tissues were treated with the tested product and 3 were treated with 5% SDS (positive control). As negative controls we used 3 not treated tissues (maintained in D-PBS during the incubation period). The test substance is considered to be irritant to vaginal epithelium if the tissue viability after exposure is $\leq 60\%$.

*The MTT assay showed that the viability of the tissues treated with the tested product is equal to **105.9%**, showing that **the product is not irritant for vaginal epithelium.***



INTRODUZIONE

I modelli *in vitro* per lo studio della pelle umana sono strumenti fondamentali per la ricerca e lo sviluppo sia in ambito farmaceutico che cosmetico. La pelle umana è ovviamente il miglior modello possibile per tali studi *in vitro*, sebbene il suo uso sia vincolato da numerosi limiti morali e legali. La pelle di animali rappresenta una possibile alternativa, ma vi sono numerosi dubbi sulla possibilità di estendere i risultati così ottenuti alla pelle umana. Inoltre il Regolamento Europeo 1223/2009 vieta la sperimentazione su animali sia dei prodotti cosmetici finiti che degli ingredienti (o combinazioni di ingredienti) destinati ad essere contenuti nei prodotti cosmetici. Per questi motivi negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi modelli di tessuti umani: tali modelli sono stati sottoposti a diversi test per valutare la possibilità del loro impiego in sostituzione dei tessuti animali. A questo scopo devono ovviamente avere delle caratteristiche il più simili possibile a quelle principali dei tessuti umani.

Il test è stato condotto su un modello di tessuto tridimensionale ricostruito di epitelio vaginale umano (HVE) composto da cellule derivate da un carcinoma epidermoide vaginale coltivate su un filtro di policarbonato inerte all'interfaccia liquido/aria in uno specifico medium. Questo modello rappresenta un tessuto epiteliale privo di strato corneo, istologicamente simile all'epitelio vaginale *in vivo*.

L'irritazione indotta da sostanze chimiche è il risultato di una cascata di eventi che inizia con la penetrazione delle sostanze stesse attraverso gli strati più superficiali del tessuto verso le cellule sottostanti. Le cellule danneggiate possono rilasciare mediatori dei processi infiammatori ed attivare una cascata infiammatoria che può coinvolgere anche le cellule del derma, in particolare le cellule dello stroma e dell'endotelio vasale. Sono proprio la dilatazione e l'aumentata permeabilità dei vasi sanguigni i principali responsabili di eritema ed edema. Il modello HVE, pur in assenza di un sistema di vascolarizzazione, permette di studiare gli eventi iniziali di questa cascata, come ad esempio il danno a cellule e tessuti, mediante analisi della vitalità cellulare.

La vitalità cellulare viene misurata mediante la conversione enzimatica del colorante MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, Tiazolil blue tetrazolio bromuro] in un sale di formazano viola che viene quantificato spettrofotometricamente dopo estrazione dai tessuti. Le sostanze irritanti sono riconosciute grazie alla loro capacità di ridurre la vitalità cellulare al di sotto di valori soglia ben definiti.



INTRODUCTION

In vitro models to study human skin are important tools for research and development in the pharmaceutical and cosmetic industries. Human skin is the best possible model for such in vitro studies however, there are a number of legal and ethical issues concerning the use of human tissues. Animal skin is an alternative, but the relevance of conclusions drawn from animal data for human skin has always been questionable and moreover the EU regulation 1223/2009 prohibits use of animals for gathering toxicological data for cosmetic ingredients. In recent years several artificial human tissue models have been developed: these models have undergone various testing in order to evaluate the possibility of using them to replace animal testing. For this purpose, they must mimic the relevant properties of human tissues as closely as possible.

The test was conducted on reconstructed human vaginal epithelium (HVE) model composed of cells derived from vulval epidermoid carcinoma cultivated on an inert polycarbonate filter at the air liquid interface in a chemically defined medium. This model forms an epithelial tissue devoid of stratum corneum, resembling histologically to the vaginal epithelium in vivo.

Chemical-induced irritation is the result of a cascade of events beginning with penetration of the chemicals through the upper cells layer where they may damage the underlying layers. The damaged cells may either release inflammatory mediators or induce an inflammatory cascade. It is the dilation and increased permeability of the endothelial cells that produce the observed erythema and oedema. Notably, the HVE-based test methods, in the absence of any vascularisation in the in vitro test system, measure the initiating events in the cascade, e.g. cell / tissue damage, using cell viability as readout.

Cell viability is measured by enzymatic conversion of the vital dye MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide], into a purple formazan salt that is quantitatively measured after extraction from tissues. Irritant chemicals are identified by their ability to decrease cell viability below defined threshold levels.



SCOPO

Lo scopo del test è stato quello di valutare la potenziale azione irritante del prodotto testato su epitelio vaginale umano ricostruito (HVE).

AIM

The aim of the test was to evaluate the potential irritant action of the tested product on reconstructed human vaginal epithelium (HVE).



MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Tessuti

Il tessuto tridimensionale ricostruito di epitelio vaginale è un epitelio ottenuto da cellule derivate da un carcinoma epidermoide vaginale coltivate su un filtro di policarbonato inerte all'interfaccia liquido/aria in uno specifico medium. Questo modello forma un tessuto epiteliale privo di strato corneo, istologicamente simile all'epitelio vaginale in vivo.

Tissues

Reconstructed vaginal epithelium is composed of cells derived from a vulval epidermoid carcinoma cultivated on an inert polycarbonate filter at the air liquid interface in a chemically defined medium. This model forms an epithelial tissue devoid of stratum corneum, resembling histologically to the vaginal epithelium in vivo.

Sostanze testate / *Tested chemicals*

Controllo negativo / *Negative control*

soluzione tampone fosfato (DPBS) / *phosphate buffered saline (DPBS)*

Controllo positivo / *Positive control*

5% Sodio dodecilsolfato (SDS) / *sodium dodecyl sulphate (SDS)*

Campione / *Sample*

Edonelle intense

Valutazione della possibile interazione tra MTT e prodotto testato

Le sostanze che assorbono la luce alla stessa lunghezza d'onda del formazano o che sono in grado di ridurre direttamente MTT a formazano, possono interferire con le misure di vitalità condotte sui tessuti e richiedono pertanto l'impiego di protocolli modificati. Per valutare la possibile interazione diretta con MTT, in un pozzetto di una piastra da 24 pozzetti sono stati aggiunti 300 µl di soluzione di MTT (1 mg/ml) e 16 µl della sostanza da testare o di acqua (come controllo). Dopo 3 ore (\pm 5 minuti) di incubazione a 37°C al buio si è osservato il colore della soluzione: un colore giallo indica assenza di interazione, un colore viola chiaro indica un'interazione debole, un colore viola scuro indica una forte interazione tra prodotto testato e MTT. Negli ultimi due casi è necessario introdurre un fattore di correzione che tenga conto della riduzione diretta dell'MTT operata dalla sostanza. Per farlo è necessario eseguire il protocollo applicato su tessuti vivi anche su porzioni di epidermide morta.

Evaluation of possible direct MTT reduction with tested product

Test chemicals absorbing light in the same range as MTT formazan and test chemicals able to directly reduce the vital dye MTT (to MTT formazan) may interfere with the tissue viability measurements and need the use of adapted controls for corrections. To assess the possible direct interaction with MTT, in a well of a 24-well plate were added 300 µl of MTT (1 mg/ml) solution and 16 µl of the tested product or water (for control). After a 3 hours (\pm 5 minutes) period of incubation at 37°C in the dark, we proceeded to visual scoring of MTT interaction as follow: yellow color indicates the absence of interaction, a light purple color indicates slight interaction, a dark purple color indicates a strong interaction between the tested product and MTT. In the last two cases it is necessary to introduce a correction factor that takes into account the non specific reduction of MTT. To do that, we must carry out the same protocol used on living tissue also on killed epidermis.

Determinazione della vitalità cellulare tramite test MTT

La vitalità cellulare è stata misurata tramite il saggio MTT. La base chimica del test è la riduzione dell'MTT, una sostanza gialla in soluzione, a formare cristalli di formazano color viola. Tale processo di riduzione ha luogo prevalentemente nel citoplasma e in minor misura nei mitocondri e sulla membrana cellulare, ed è altamente dipendente dalle concentrazioni intracellulari di NADH e NADPH. Come conseguenza di questi processi metabolici, nel giro di alcune ore appaiono cristalli viola di formazano che possono essere scolti in isopropanolo. L'assorbimento dei cristalli solubilizzati può essere misurato alla lunghezza d'onda di 540 nm ed è proporzionale al numero di cellule vive in un range lineare molto ampio.

Determination of cell viability by MTT assay

Cell viability was assessed by MTT assay. The chemical basis of the assay is the reduction of the MTT, a slightly yellow substance, which forms a purple formazan upon reduction. The process primarily takes place in the cytoplasm, and to a lesser extent in the mitochondria and cell membrane, and it is highly dependent on the concentration of intracellular NADH and NADPH. As a consequence of these metabolic processes, dark purple needle-like formazan crystals appear, radiating from the cells in a few hours. Formazan crystals can be solubilized in isopropanol. The absorption of the solubilized crystals can be measured at 540 nm wavelength and it is proportional to the viable cell number in an exceptionally wide linear range.



Protocollo sperimentale

Pre-incubazione

I tessuti sono stati lasciati in terreno di crescita per almeno 2 ore (37°C, 5% CO₂) prima del trattamento

Trattamento

I tessuti sono stati trattati per 60 minuti ± 1 minuto a temperatura ambiente con 30 µl ± 0.5 µl di sostanza secondo il seguente schema:

- Controllo negativo DPBS
- Controllo positivo SDS 5%
- Campione testato **TS**

Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato

Lavaggi

I tessuti sono stati ripetutamente lavati con DPBS, allo scopo di eliminare ogni traccia delle sostanze utilizzate per i trattamenti

Post-incubazione

I tessuti sono stati trasferiti in terreno di crescita per 42 ore ± 60 minuti (37°C, 5% CO₂).

Saggio MTT

I tessuti sono stati trattati con MTT (1 mg/ml) per 3 ore ± 5 minuti (37°C, 5% CO₂) e quindi i cristalli di formazano sono stati estratti in isopropanolo per 2 ore ± 5 minuti a temperatura ambiente. La lettura della densità ottica è stata effettuata a 540 nm

Experimental protocol

Pre-incubation

The tissues were left in growth medium for at least 2 hours (37 ° C, 5% CO₂) before treatment

Treatment

The tissues were treated for 60 minutes ± 1 minute at room temperature with 30 µl ± 0.5 µl of the substance according to the following scheme:

- *Negative control* DPBS
- *Positive control* 5% SDS
- *Tested sample* **TS**

Each experiment was conducted in triplicate.

Rinsing

The tissues were repeatedly rinsed in DPBS in order to remove all traces of the substances used for the treatments

Post-incubation

The tissues were transferred to growth medium for 42 hours ± 60 minutes (37°C, 5% CO₂).

MTT assay

The tissues were treated with MTT (1 mg/ml) for 3 hours ± 5 minutes (37°C, 5% CO₂) and then the formazan crystals were extracted in isopropanol for 2 hours ± 5 minutes at room temperature. Optical density read at 540 nm.



RISULTATI

RESULTS

Interpretazione dei risultati

Interpretation of results

Criteria per l'interpretazione <i>in vitro</i> <i>Criteria for in vitro interpretation</i>	Predizione in vivo <i>In vivo prediction</i>
Vitalità media dei tessuti $\leq 60\%$ <i>Mean tissue viability is $\leq 60\%$</i>	Prodotto irritante <i>Irritant product</i>
Vitalità media dei tessuti $> 60\%$ <i>Mean tissue viability is $> 60\%$</i>	Prodotto non irritante <i>Not irritant product</i>

Analisi dei dati e calcolo dei risultati

Data analysis and calculation of results

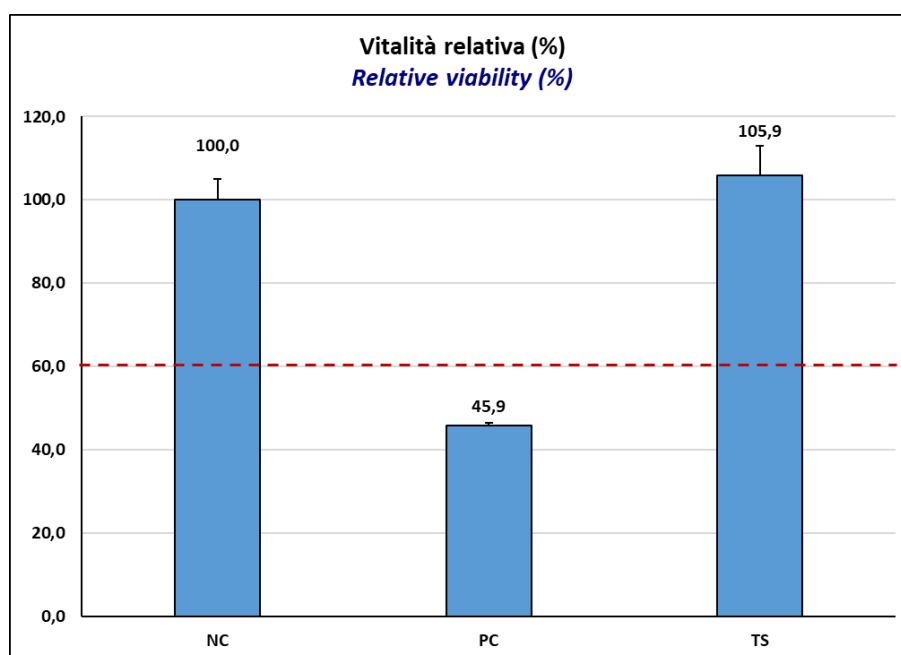
Vitalità / *Viability* % = $[OD_T / OD_{NC}] \times 100$

OD_T Densità ottica media dei tessuti trattati / *Mean optical density of treated tissues*

OD_{NC} Densità ottica media dei controlli negativi / *Mean optical density of not treated tissues*

Trattamento <i>Treatment</i>	OD	Vitalità dei tessuti (%) <i>Tissue Viability (%)</i>
NC: Controllo negativo / <i>Negative control</i>	1.007 ± 0.051	100.0 ± 5.08
PC: Controllo positivo / <i>Positive control</i>	0.462 ± 0.007	45.9 ± 0.66
TS	1.067 ± 0.071	105.9 ± 7.05

I valori di OD riportati in tabella sono la media di 3 determinazioni e calcolati tenendo conto del fattore di correzione
The OD values in the table are the average of 3 experiments and calculated taking into account the correction factor



Nei tessuti trattati con il prodotto testato la vitalità è pari a 105.9% del controllo negativo, il che indica che il prodotto non è irritante.

In tissues treated with the tested product, tissue viability was 105.9% of the negative control, and this means that the product does not irritate.

CONCLUSIONI

Il campione denominato

Edonelle intense

E' potenzialmente privo di azione irritante su epitelio vaginale

In presenza del prodotto la vitalità dei tessuti è pari a **105.9%** rispetto al controllo non trattato

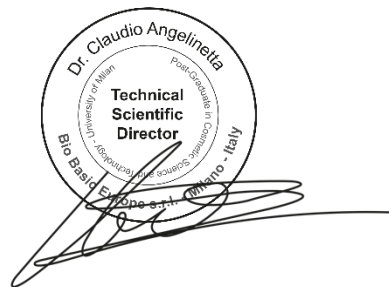
CONCLUSIONS

The sample called

Edonelle intense

Is potentially not irritant for vaginal epithelium

In the presence of the product tissue viability is 105.9% of untreated controls



Dr. Claudio Angelineta
Post-Graduate in Cosmetic Sciences
University of Milan
Bio Basic Europe S.r.l. - Milano - Italy
Technical Scientific Director

Il presente Rapporto di Prova è firmato digitalmente ai sensi della normativa vigente
This test report is digitally signed according to current legislation



BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

- Fartasch M, Ponc M. Improved barrier structure formation in air-exposed human keratinocyte culture systems. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 366-374
- Kandárová H. Dissertation: Evaluation and validation of reconstructed human skin models as alternatives to animal tests in regulatory toxicology. Free University of Berlin, 2006
- Kandárová H, Liebsch M, Spielmann H, Genshow E, Schmidt E, Traue D, Guest R, Whittingham A, Warren N, Gamer AO, Remmele M, Kaufmann T, Wittmer E, De Wever B, Rosdy M. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemical according to new OECD TG431. *Toxicology In Vitro*. 2006; 20: 547-59
- Doucet O, Garcia N, Zastrow L. Skin culture model: a possible alternative to the use of excised human skin for assessing in vitro percutaneous absorption. *Toxicology in Vitro* 1998; 12: 423-430
- De Brugerolle de Fraisinette A, Picarles V, Chibout S, Kolopp M, Medina J, Burtin P, Ebelin ME, Osborne S, Mayer F.K, Spake A, Rosdy M, De Wever B, Ettl RA, Cordier A. Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic®) applied to the testing of topical vehicles. *Cell Biol Toxicology* 1999; 15: 121-135
- Tornier C, Rosdy M, Maibach HI. In vitro skin irritation testing on reconstituted human epidermis: reproducibility for 50 chemicals tested with two protocols. *Toxicology In Vitro* 2006; 20: 401-416
- Kandárová H, Liebsch M, Schmidt E, Genshow E, Traue D, Meyer K, Spielmann H, Steinoff C, Tornier C, De Wever B, Rosdy M. Assessment of the skin irritation potential of chemicals by using the SkinEthic reconstructed human epidermal model and the common skin irritation protocol evaluated in the ECVAM skin irritation study. *Alternatives to Laboratory Animals* 2006; 34: 393-406
- Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55-63
- Rosdy M. Reconstituted epidermis for testing. *Cosmetics and Toiletries Manufacture. Worldwide* 1994: pp. 223-226
- Spielmann H, Hoffmann S, Liebsch M, Botham P, Fentem J, Eskes C, Roguet R, Cotovio J, Cole T, Worth A, Heylings J, Jones P, Robles C, Kandárová H, Gamer A, Remmele M, Curren R, Raabe H, Cockshott A, Gerner I, Zuang V. The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 207; 35: 559-601
- Hoffmann S. ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . 2006; Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]
- De Wever B, Charbonnier V. Using tissue engineered skin to evaluate the irritation potential of skin care products. *Cosmetics and Toiletries*. 2002; 119(9): 28-36
- Welss T, Basketter D.A, Schröder K.R. In Vitro Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 2004; 18: 231-243
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4: 14-19
- Alépée N, Grandidier MH, Tornier C, Cotovio J. An integrated testing strategy for in vitro skin corrosion and irritation assessment using SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis. *Toxicol In Vitro* 2015; 29(7): 1779-92