

**TEST DI IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO
(ISO 10993-10, Metodo di prova ISO/TC 194 WG 8)**

***IN VITRO SKIN IRRITATION TEST
(ISO 10993-10, ISO/TC 194 WG 8 protocol)***

CLARION LIVING SRL

ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S

Protocollo n° / *Report no.* **2018I11V3-1**

<p>Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Eliana REGOLA, Riccardo VICINI</p> <p>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.</p> <p>Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab <i>Project Responsible Bio Basic Lab</i> Dr.ssa Eliana 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)</p> <p>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)</p> <p>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)</p>	<p>INDICE INDEX</p> <p>Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3</p> <p>Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4</p> <p>Scopo <i>Aim</i> pag. 6</p> <p>Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 7</p> <p>Risultati <i>Results</i> pag. 10</p> <p>Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 11</p> <p>Bibliografia <i>References</i> pag. 12</p>
---	---

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, being it a scientific and technical document protected by Copyright.
No part of this document may be reproduced in any form without the prior written authorization of Bio Basic Europe S.r.l.
Based on our experience, we suggest to check every 3 years its compliance with the guidelines in force.*

RIASSUNTO

Per studiare la potenziale irritazione cutanea del prodotto testato, il campione è stato sottoposto ad un processo di estrazione sia in solvente polare che apolare e gli estratti sono stati quindi applicati su epidermide umana ricostruita (RHE) di cui è stata successivamente valutata la vitalità cellulare mediante test MTT. Ciascun estratto è stato testato su 3 differenti tessuti RHE. Il campione testato viene considerato irritante per la pelle se la vitalità cellulare dei tessuti in seguito a trattamento è $\leq 50\%$.

Dai risultati del test MTT è emerso che la vitalità dei tessuti trattati con il campione testato è pari a **100.7%** per l'estratto in solvente polare e a **111.8%** per l'estratto in solvente apolare, dimostrando che **il prodotto testato non è irritante per la cute.**

ABSTRACT

To assess the potential skin irritation of the tested product, the sample underwent a process of extraction both in polar and non-polar solvent vehicles and the extracts were applied on reconstructed human epidermis (RHE) 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 skin irritation potential. Each extract was tested on 3 different RHE tissues. The test sample is considered to be irritant to skin if the tissue viability after exposure is $\leq 50\%$.

*The MTT assay showed that the viability of the tissues treated with the tested product is equal to **100.7%** for the extract in polar vehicle and **111.8%** for the extract in non-polar vehicle, showing that **tested product is not irritant for the skin.***

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 pelle umana: 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 della pelle umana.

Il modello di epidermide umana ricostruita (RHE) è costituito da cheratinociti umani normali coltivati su un filtro inerte di policarbonato all'interfaccia aria-liquido. Esso rappresenta un modello di epidermide altamente differenziata e stratificata, comprendente lo strato basale, spinoso, granulare e corneo. Il modello RHE presenta una composizione e delle caratteristiche morfologiche, istologiche e biochimiche paragonabili a quelle dei tessuti umani in vivo, ed è pertanto particolarmente utile in numerosi studi di tossicità e di permeabilità. Il suo impiego nei test di irritazione cutanea prevede l'applicazione topica del prodotto da testare sulla superficie dell'epidermide e la successiva valutazione dei suoi effetti sulla vitalità cellulare.

L'irritazione cutanea indotta da sostanze chimiche, che si manifesta principalmente con eritema ed edema, è il risultato di una cascata di eventi che inizia con la penetrazione delle sostanze stesse attraverso lo strato corneo e successivo danno agli strati di cheratinociti e di altre cellule cutanee sottostanti. Le cellule danneggiate possono inoltre 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 RHE, 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 skin 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 skin as closely as possible.

The RHE model consists of normal human keratinocytes cultured on an inert polycarbonate filter at the air-liquid interface. It represents a highly differentiated and stratified epidermis model comprising the main basal, supra basal, spinous and granular layers and a functional stratum corneum. The RHE model presents a histological morphology, composition and aspects of biochemistry comparable to the in vivo human tissue, so it is useful in several toxicity and permeability tests. Its use for skin irritation testing involves topical application of the product to the surface of the epidermis, and the subsequent assessment of its effects on cell viability.

Chemical-induced skin irritation, manifested mainly by erythema and oedema, is the result of a cascade of events beginning with penetration of the chemicals through the stratum corneum where they may damage the underlying layers of keratinocytes and other skin cells. The damaged cells may either release inflammatory mediators or induce an inflammatory cascade which also acts on the cells in the dermis, particularly the stromal and endothelial cells of the blood vessels. It is the dilation and increased permeability of the endothelial cells that produce the observed erythema and oedema. Notably, the RHE-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 epidermide umana ricostruita (RHE).

Il test è stato effettuato sul liquido di estrazione ottenuto incubando il prodotto in soluzione salina (NaCl 0.9%) e in olio di sesamo per 72 ore a 37°C.

AIM

The aim of the test was to evaluate the barrier effect of the tested product on reconstructed human epidermis (RHE).

The test was carried out on the liquid of maceration obtained incubating the product in saline (NaCl 0.9%) and sesam oil for 72 hours at 37°C.

MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Tessuti

L'epidermide umana ricostruita è formata da cheratinociti umani normali coltivati su un filtro inerte di policarbonato all'interfaccia aria-liquido in un mezzo di crescita chimicamente ben definito.

Tissues

Reconstructed Human Epidermis consists of normal human keratinocytes cultured on an inert polycarbonate filter at the air-liquid interface, in a chemically defined medium.

Trattamenti eseguiti / *Treatments performed*

NC	Controllo Negativo (D-PBS) / <i>Negative control (D-PBS)</i>
PC1	Controllo Positivo (SDS 1%) in solvente polare / <i>Positive Control (SDS 1%) in polar vehicle</i>
PC2	Controllo Positivo (SDS 1%) in solvente apolare <i>Positive Control (SDS 1%) in non-polar vehicle</i>
TS1	Estratto del campione in solvente polare <i>Extract of the sample in polar vehicle</i>
TS2	Estratto del campione in solvente apolare <i>Extract of the sample in non-polar vehicle</i>
V1	Solvente polare <i>Polar vehicle</i>
V1	Solvente apolare <i>Non-polar vehicle</i>

Campione / *Sample*

ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S

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 sciolti 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

Preparazione degli estratti

Gli estratti sono stati preparati attenendosi alle linee guida ISO 10993-12. Come solvente polare è stata utilizzata una soluzione salina di NaCl allo 0.9%, come solvente apolare è stato utilizzato olio di sesamo. L'estrazione è stata condotta a 37°C per 72 ore sotto continua agitazione.

Pre-incubazione

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

Trattamento

Su ciascun tessuto sono stati applicati 100 µl di estratti o dei controlli. I tessuti sono stati quindi incubati in condizioni standard per 18 ore. Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato.

Lavaggi

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

Saggio MTT

I tessuti RHE sono stati trattati con MTT (1 mg/ml) per 3 ore e quindi i cristalli di formazano sono stati estratti in isopropanolo per 2 ore. La lettura della densità ottica è stata effettuata a 540 nm

Experimental protocol

Preparation of the extracts

The extracts were prepared according to ISO 10993-12 guidelines. We used as polar vehicle a saline solution of 0.9% NaCl, while as non-polar vehicle we used sesam oil. The extraction was performed at 37°C for 72 hours with continuous shaking.

Pre-incubation

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

Treatment

Each RHE tissue was treated with 100 µl of the extracts or of the controls. The tissues were then incubated at standard conditions for 18 hours. Each experiment was conducted in triplicate.

Rinsing

RHE tissues were repeatedly rinsed in D-PBS in order to remove all traces of the substances used for the treatments

MTT assay

RHE tissues were treated with MTT (1 mg/ml) for 3 hours and then the formazan crystals were extracted in isopropanol for 2 hours. Optical density read at 540 nm.

RISULTATI / RESULTS

La vitalità relativa di ciascun tessuto è stata calcolata in base ai valori di densità ottica (OD) misurata secondo la seguente formula

The relative viability of each tissue was calculated on the basis of measured optical density (OD) values according to the following formula

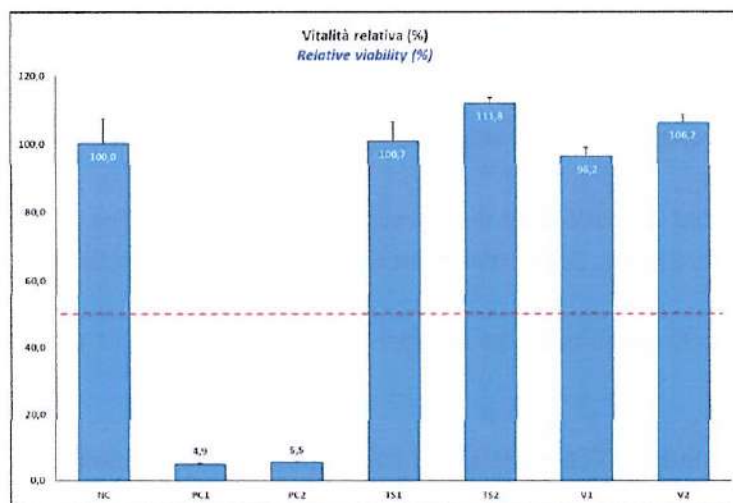
$$\text{Vitalità / Viability \%} = [\text{OD}_x / \text{OD}_{\text{NC}}] \times 100$$

OD_x 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*

Un estratto viene considerato potenzialmente irritante se la vitalità relativa dei tessuti è ≤ 50% di NC
The irritation potential is predicted if the relative viability of the tissues is ≤ 50% of NC

Treatment	OD	Tissue Viability (%)
NC	1.329 ± 0.097	100.0 ± 7.32
PC1	0.065 ± 0.002	4.9 ± 0.18
PC2	0.073 ± 0.002	5.5 ± 0.15
TS1	1.338 ± 0.077	100.7 ± 5.77
TS2	1.486 ± 0.023	111.8 ± 1.70
V1	1.279 ± 0.036	96.2 ± 2.72
V2	1.412 ± 0.029	106.2 ± 2.17



I valori sono espressi come medie ± deviazione standard derivati dai risultati del trattamento di almeno 3 tessuti. NC = Controllo Negativo (D-PBS); PC1 = Controllo Positivo (SDS 1%) in solvente polare; PC2 = Controllo Positivo (SDS 1%) in solvente apolare; TS1 = Estratto del campione in solvente polare; TS2 = Estratto del campione in solvente apolare; V1 = Solvente polare; V2 = Solvente apolare.

The values are expressed as means ± standard deviation deriving from the treatment of at least 3 tissues. NC = Negative control (D-PBS); PC1 = Positive Control (SDS 1%) in polar vehicle; PC2 = Positive Control (SDS 1%) in non-polar vehicle; TS1 = Extract of the sample in polar vehicle; TS2 = Extract of the sample in non-polar vehicle; V1 = Polar vehicle; V2 = Non-polar vehicle

CONCLUSIONI

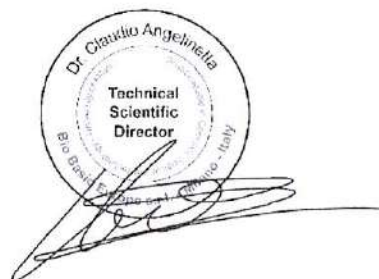
Il campione denominato
ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S
Non ha azione irritante per la cute

La vitalità relativa dei tessuti trattati con l'estratto in solvente polare è 100.7% del controllo negativo
La vitalità relativa dei tessuti trattati con l'estratto in solvente apolare è 111.8% del controllo negativo

CONCLUSIONS

The sample called
ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S
Is not skin irritant

The relative viability of the tissues treated with the extract in polar vehicle is 100.7% of negative control
The relative viability of the tissues treated with the extract in non-polar vehicle is 111.8% of negative control



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

De Jong WH, Hoffmann S, Lee M, Kandárová H, Pellevoisin C, Haishima Y, Rollins B, Zdawczyk A, Willoughby J, Bachelor M, Schatz T, Skoog S, Parker S, Sawyer A, Pescio P, Fant K, Kim KM, Kwon JS, Gehrke H, Hofman-Hüther H, Meloni M, Julius C, Briotet D, Letasiova S, Kato R, Miyajima A, De La Fonteyne LJJ, Videau C, Tornier C, Turley AP, Christiano N, Rollins TS, Coleman KP. Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RhE) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. *Toxicol In Vitro*. 2018 Aug;50:439-449

Kandarova H, Willoughby JA, De Jong WH, Letasiova S, Milasova T, Bachelor MA, Breyfogle B, Handa Y, De la Fonteyne L, Coleman KP. Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm™. *Toxicol In Vitro*. 2018 Aug;50:407-417.

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

ISO (2009) ISO/TC 194 10993-5 - Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (2010) ISO/TC 194 10993-10 - Biological evaluation of medical devices -- Part 10: Tests for irritation and skin sensitization. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (2012) ISO/TC 194 10993-12 - Biological evaluation of medical devices -- Part 12: Sample preparation and reference materials. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Kandárová H., Hayden, P., Klausner, M., Kubilus, J., Kearney, P. and Sheasgreen, J. (2009): In Vitro Skin Irritation Test: Improving the Sensitivity of the EpiDerm Skin Irritation Test Protocol. *ATLA* 37 (6), pp. 671 – 669.

Kandárová H., Willoughby, J.A., de Jong, W.H., Bachelor, M., Letasiova, S., Milasová, T., Breyfogle, B., de la Fonteyne, L., Coleman, K.P. (2015). Development, Optimization, and Standardization of an In Vitro Skin Irritation Test for Medical Devices Using the Reconstructed Human Tissue Model EpiDerm. *The Toxicologist*, Supplement to Toxicological Sciences 144, Abstract 2017, 2015.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods* 65, 55-62.

OECD (2015): OECD guideline for the testing of chemicals No 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.