

REPORT METODO ISO 10993-5:2009 BIOLOGICAL EVALUATION
"in vitro": cytotoxicity test

COD. LAB.: 1903011
Data emissione: 10/04/2019
Rev. 0
Citotossicità test <i>in vitro</i>

Valutazione "*in vitro*" della valutazione biologica: Prova di citotossicità in base al metodo UNI EN ISO 10993-5

According the method UNI EN ISO 10993-5 the biological evaluation "in vitro": cytotoxicity test.

The international standard's for all materials and product by the international biocompatibility standard ISO 10993-5, "Guidance on the Selection of Tests, specific tests that can be used to satisfy these requirements are then provided in ISO 10993-5, both sensitization and irritation.

Committente:

NAMI PROJECT S.r.l.s.
www.namiorganic.com

Denominazione del prodotto:

NAMI LOZIONE POLIFUNZIONALE a base probiotica
viso, corpo capelli

Data ricevimento campione / *Reception date*: 01/03/2019

Periodo di analisi: *Period of analysis*:

Data inizio analisi / *Date of testing*: 18/03/2019

Data fine analisi / *End Date test*: 10/04/2019

1_Introduzione / Introduction

UNI EN ISO 10993-5 2009.

La presente parte della ISO 10993-5 descrive i metodi di prova per valutare la citotossicità “*in vitro*” dei prodotti che vengono a contatto con la cute umana oppure che devono essere applicati sulla cute o mucosa umana, consente di determinare l’eventuale effetto citotossico del prodotto in esame, impiegando specifiche colture cellulari coltivate “*in vitro*”.

Questo metodo specifica che il prodotto è posto ad incubare a diretto contatto con le cellule in coltura o tramite una tecnica di diffusione del prodotto in esame. Il protocollo di analisi è stato studiato per determinare la risposta biologica “*in vitro*” di colture cellulari composte da cellule di mammifero, utilizzando appropriati parametri biologici.

La determinazione della citotossicità può essere raggruppata in categorie a seconda del tipo di valutazione:

- a) valutazioni del danno cellulare tramite mezzi morfologici;
- b) misurazioni del danno cellulare;
- c) misurazioni della crescita cellulare;
- d) misurazioni di aspetti specifici del metabolismo cellulare.

This European standard ISO 10993-5 specifies test method and minimum requirements to evaluate the cytotoxicity of chemical substance for different applications in various fields (medical, cosmetic, ecc.).

Under this standard, the test product is tested using in vitro cell culture under defined test conditions, including temperature and contact time, to demonstrate the possible cytotoxic effect and to determine the biological response of mammalian cells in vitro using appropriate biological parameters.

The determination of cytotoxicity depending on the type of evaluation the following:

- a) assessments of cell damage by morphological means;*
- b) measurements of cellular damage;*
- c) measurements of cell growth;*
- d) measurements of specific aspects of cellular metabolism.*

2_Metodo di Prova a Contatto Diretto / Test Method a Direct Contact

Il metodo di prova della norma ISO 10993-5 2009 riguarda la valutazione del potenziale irritante *in vitro* di un dispositivo medico su cellule di derivazione della mucosa nasale.

Il potenziale citotossico del prodotto da sottoporre a test a contatto diretto è stato valutato su linee cellulari di derivazione mucosa nasale: fibroblasti umani.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT.

L'MTT è un sale di tetrazolio dal colore giallo, che ridotto dall'enzima succinato deidrogenasi forma un precipitato blue di formazano nei mitocondri delle cellule vitali. Il formazano precipitato è un indicatore della vitalità cellulare.

The test method of ISO 10993-5 2009 is irritation potential assay of a medical device in vitro on cells derived from nasal mucosa. The cytotoxic potential of the product to be tested was assessed on cell lines derived from nasal mucosa: human fibroblasts. Cell viability was assessed by MTT assay. The tetrazolium salt MTT is a yellow color, which reduced by the enzyme succinate dehydrogenase form a precipitate of blue formazan in the mitochondria of viable cells. The precipitate formazan is an indicator of cell viability.

3_Materiali e Reagenti / Materials and Reagents

Colture Cellulari / Cell Cultures:

Le linee cellulari indicate dalla norma ISO 10993-5 utilizzate sono le seguenti:

- CCL 81 (Vero) fibroblasti * / *fibroblasts* *

- Fibroblasti umani di mucosa nasale coltivati su un substrato di fibroblasti 3T3 clone A31

*

Human fibroblasts of the nasal mucosa grown on a substrate of 3T3 fibroblasts clone A31

*

* linee cellulari American Type Culture Collection.

Terreni di Coltura e Reagenti / Culture Media and Reagents

Minimum Essential Medium (DMEM) (BioWithaker Europe) addizionate con il 10% di siero fetale bovino (SFB), l'1% di L - glutammina e l'1% di penicillina - streptomicina (pen - strep). / *Minimum Essential Medium (MEM-BioWithaker Europe) supplemented with appropriate concentration of inactivated and mycoplasma-free foetal calf serum (FCS) 10%, L - glutammyn 1% and antibiotics penicillin - streptomycin (pen - strep) 1%.*

Soluzioni per colture cellulari: / *Phosphate Buffered Saline for cell cultures:*

Soluzione PBS salina Tris-buffer (TBS) (25 mM Tris)

The Phosphate Buffered Saline PBS is Tris-buffer (TBS) (25 mM Tris.

Soluzione di Tripsina - Versene per la disaggregazione delle cellule /

Trypsin-Versene (EDTA [ethylenediaminetetraacetic acid]):

4_ Determinazione della Citotossicità / Evaluation of Cytotoxicity

La citotossicità è stata determinata qualitativamente e quantitativamente:

1) VALUTAZIONE QUALITATIVA consiste nell'esaminare le cellule al microscopio, utilizzando un colorante citochimico / vitale per osservare le eventuali alterazioni, quali morfologia, vacuolizzazione, distacco o lisi cellulare e integrità della membrana.

I risultati valutati sono stati interpretati in base alla scala di citotossicità seguente:

0 = Non citotossico

1 =Lievemente citotossico

2 =Moderatamente citotossico

3 =Gravemente citotossico

Cytotoxicity was determined qualitatively and quantitatively:

1) QUALITY EVALUATION is to examine the cells under a microscope using a dye cytochemical vital to observe the morphology, the vacuolation, or cell lysis and membrane integrity. The evaluated results were interpreted according to the scale of cytotoxicity following:

0 = Not cytotoxic

1 = Mildly cytotoxic

2 = Moderately cytotoxic

3 = Severely cytotoxic. the presence of the irritation: NOT ACCEPTABLE.

2) VALUTAZIONE QUANTITATIVA consiste nel misurare la morte cellulare, l'inibizione della crescita cellulare, la proliferazione delle cellule, il rilascio di enzimi o la riduzione di colorante vitale (MTT).

TEST MTT è una prova quantitativa colorimetrica che utilizza il colorante vitale MTT [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromuro], il quale è ridotto nei mitocondri cellulari dall'enzima deidrogenasi mitocondriale della catena respiratoria cellulare, nel sale di tetrazolio MTT. All'interno della cellula si formano cristalli di formazano di colore violetto non solubile in acqua, che vengono determinati mediante lo spettrofotometro per ottenere il numero di mitocondri e quindi il numero di cellule viventi nel campione.

2) QUANTITATIVE EVALUATION is to evaluate the cell death, inhibition of cell growth, cell proliferation, release of enzymes or reduction of vital dye (MTT). The test MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] based colorimetric assay for measurement of in vitro cytotoxicity and cell proliferation.

The numbers of viable cells growing in microplate wells can be read by an automatic microplate scanning spectrophotometer. It's examined the stability of the optical density of dissolved formazan solution by a spectrophotometer.

5_ Espressione dei Risultati/ *Expression of Results*

Il risultato è espresso in tabella come IC50 della formula seguente:

The result is expressed as IC50 of the following formula:

$$\% \text{ inibizione vitalità cellulare} = \left[1 - \frac{\text{OD}_{570} \text{ Cellule trattate/} \textit{treated cells}}{\text{OD}_{570} \text{ Cellule non trattate/} \textit{untreated cells}} \right] \times 100$$

Cell viability inhibition (%)

OD = densità ottica / optical density

Il **valore IC50** indica la concentrazione di prodotto necessaria per inibire la crescita cellulare del 50%. IC50 è un parametro che consente di valutare il potenziale irritante di un composto, come segue:

IC50 < 0,5 indica un forte effetto citotossico/irritante.

IC50 tra 0,5 e 1,5 indica un moderato effetto citotossico/irritante.

IC50 > 1,5 indica assenza di qualsiasi effetto citotossico/irritante.

6_Risultati / Results:

Committente: **NAMI PROJECT S.r.l.s.**
www.namiorganic.com

Denominazione del prodotto:
NAMI LOZIONE POLIFUNZIONALE a base probiotica
viso, corpo capelli

Tabella 1 / Table 1: Risultati a diretto contatto / *Results evaluation qualitative*

Concentrazione / concentration µg/ml	Osservazione M.O. / Observation M.O.	Valore/ Value	Interpretazione del risultato/ Interpretation of results
Controllo positivo:/ <i>Positive control:</i> SDS 0.06 mg/ml	alterazione del monostrato cellulare: distacco cellulare presenza cellule morte/ <i>alteration of the cell monolayer:</i> <i>cellular detachment presence cell death</i>	3,0	Gravemente citotossico/ <i>Severely cytotoxic</i>
Controllo negativo / <i>Negative control:</i> D-MEM	Nessuna alterazione / <i>no alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
Colture cellulare / <i>cell culture</i>	Nessuna alterazione / <i>no alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C3 100 µg/ml	Nessuna alterazione / <i>no alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C2 200 µg/ml	Nessuna alterazione / <i>no alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C1 400 µg/ml	Lieve sofferenza cellulare/ <i>Slight cell suffering</i>	1	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>

Tabella 2 / Table 2: Risultati test MTT *Results evaluation quantitative*

Risultati della % di inibizione della vitalità cellulare / *Cell viability inhibition (%)*
Spettrofotometro: MULTISKAN MS PRIMARY EIA

Concentrazione / concentration µg/ml	% inibizione della vitalità cellulare / <i>Cell viability inhibition (%)</i> Valori medi /	IC₅₀	RISULTATO / <i>RESULT</i> MTT TEST
Controllo positivo/ <i>Positive control:</i> SDS 0.06 mg/ml	0.438 0.419 0.424	< 0,5	Citotossico / <i>Cytotoxic</i>
Controllo negativo <i>Negative control:</i> D-MEM	2.123 2.118 2.121	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
Colture cellulare / <i>cell culture</i>	-	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C3 100 µg/ml	1.611 1.622 1.610	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C2 200 µg/ml	1.608 1.609 1.606	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
C1 400 µg/ml	1.600 1.605 1.603	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>

7_CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

In base ai risultati ottenuti, il prodotto in esame denominato /
According to the obtained results, the test product called:

Committente:

NAMI PROJECT S.r.l.s.
www.namiorganic.com

Denominazione del prodotto:

NAMI LOZIONE POLIFUNZIONALE a base probiotica
viso, corpo capelli

risulta *"in vitro"* NON CITOTOSSICO, in quanto non si evidenziano significativi effetti irritanti sulle colture cellulari di fibroblasti umani, secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 10993-5:2009. Non sono presenti effetti citotossici significativi sulle cellule trattate alle concentrazioni del prodotto in esame a confronto con quelle non sottoposte al trattamento con il campione in esame.

according to UNI EN ISO 10993-5:2009 the test product were found be NOT CYTOTOXIC: no irritant effects "in vitro" in cell cultures of human fibroblasts.

There are no significant cytotoxic effects on the cells treated at the concentrations of the test product compared to those not subjected to treatment with the test sample.

Data report: / Report data: 10/04/2019

 

Prof. Pier Giorgio Balboni
(Firma / Signature) docente incaricato di insegnamento (MED/07)
come cultore della materia "Microbiologia" in collaborazione con la
Sezione di Microbiologia dell'Università degli Studi di Ferrara