

Valutazione della citotossicità di un dispositivo medico mediante un saggio in vitro su colture cellulari di fibroblasti

UNI EN ISO 10993-5: 2009 (E)

In vitro evaluation of the cytotoxicity of a medical device through an assay on fibroblasts cell cultures

UNI EN ISO 10993-5: 2009 (E)

Primo Piano Industry Srl

MASCHERINA ADULTI CON STAMPA (REF: MSKST)

Protocollo n° / *Report no.* **2021G13V-1**

<p>Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Elia 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 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)</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. 9</p> <p>Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 14</p> <p>Bibliografia <i>References</i> pag. 15</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

Il saggio di citotossicità è stato eseguito su colture di fibroblasti L929 trattati con l'estratto (liquido di cessione tal quale ottenuto dopo incubazione overnight del dispositivo medico in terreno di coltura) e successive diluizioni 1:2. Come controllo positivo è stato utilizzato il sodio dodecil solfato (SDS), una sostanza dai noti effetti citotossici, mentre come riferimento negativo è stato impiegato uno standard interno non citotossico.

I risultati ottenuti hanno mostrato che nelle cellule trattate con l'estratto tal quale la vitalità è **101.55%**. Un valore di vitalità $\geq 70\%$ indica che **il dispositivo medico testato è da considerarsi non citotossico**.

ABSTRACT

The cytotoxicity assay was performed on L929 fibroblasts cell cultures treated with the extract (liquid of maceration as it is obtained after incubation overnight of the medical device in culture medium) and subsequent 1:2 dilutions. As positive control we used sodium dodecyl sulphate (SDS), a substance with well known cytotoxic effects, while the negative reference was an internal standard with no cytotoxic effect.

*We observed that the viability of cells treated with the extract as it is was **101.55%**. A viability value $\geq 70\%$ means that **tested medical device has not cytotoxic potential**.*



INTRODUZIONE

La capacità di stimolare *in vitro* la crescita delle cellule e di non interferire con il loro metabolismo con effetti citotossici, anche a concentrazioni piuttosto elevate, può essere ritenuto un indice dell'elevata dermocompatibilità del dispositivo medico e di un potenziale ruolo nell'accelerare il turn-over della cute su cui i prodotti topici vengono direttamente applicati.

La citotossicità (cioè la proprietà di essere tossici per le cellule) è il risultato di una interferenza di una sostanza con strutture e/o proprietà essenziali per la sopravvivenza, la proliferazione e/o le funzioni delle cellule stesse. Questi effetti possono coinvolgere per esempio l'integrità delle membrane e del citoscheletro, il metabolismo, la sintesi, la degradazione o il rilascio di costituenti cellulari, la regolazione ionica e la divisione cellulare. Si possono distinguere tre diversi tipi di citotossicità: (1) citotossicità basale (o generale) che coinvolge una o più delle strutture o processi sopramenzionati e colpisce indistintamente tutte le cellule; (2) citotossicità selettiva (o cellulo-specifica) che si ha quando alcune cellule differenziate sono più sensibili rispetto ad altre all'effetto di una specifica sostanza tossica; (3) tossicità che colpisce alcune funzioni cellulari specifiche e che potrebbe non essere critica per la sopravvivenza della singola cellula ma danneggiare tessuti ed organismo (per esempio questo tipo di tossicità potrebbe colpire la comunicazione tra cellule).

Sono stati sviluppati fino ad oggi numerosi test di citotossicità *in vitro* che utilizzano diverse linee cellulari e che misurano differenti endpoint. Il test MTT qui proposto è un saggio di riduzione utilizzato per determinare il livello di attività metabolica nelle cellule eucariotiche. Si tratta di uno dei test di citotossicità più diffusi grazie alla sua semplicità, accuratezza e riproducibilità. La base chimica del saggio è la riduzione dell'MTT, un composto tetrazolico [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. MTT è una sostanza gialla che forma in seguito a riduzione un sale di formazano color viola. Il processo avviene principalmente nel citoplasma e secondariamente nei mitocondri e a livello della membrana plasmatica. L'attività delle reduttasi che catalizzano la reazione è altamente dipendente dalla concentrazione di NADH e di NADPH intracellulari, i cui livelli sono associati alla disponibilità di glucosio extracellulare. Anche la succinato deidrogenasi mitocondriale ed il citocromo C prendono parte alla riduzione di MTT. Pertanto qualsiasi sostanza o trattamento che interferisca con questi enzimi o con la glicolisi influenzerebbe la riduzione dell'MTT e di conseguenza altererebbe i risultati della conta cellulare. Come conseguenza di questi processi metabolici di riduzione si vengono quindi a formare nel giro di poche ore dei cristalli viola scuro di formazano. Tali cristalli possono essere solubilizzati in differenti solventi organici, principalmente alcoli. Un aumento o una riduzione nel numero di cellule determinerà un'analogia variazione nella quantità di formazano formatasi, dando così una indicazione del grado di citotossicità del prodotto testato.



INTRODUCTION

The ability to stimulate in vitro the growth of cells and not to interfere with their metabolism with cytotoxic effects, even at relatively high concentrations, can be considered an index of the high skin compatibility of a medical device and this also suggests a potential role of the device itself in accelerating the turn-over of the skin on which the topical products are directly applied.

The cytotoxicity (i.e. the quality of being toxic to cells) is the result of an interference of a substance with structures and/or properties essential for cell survival, proliferation and/or function. These effects can involve, for example, the integrity of membranes and the cytoskeleton, metabolism, the synthesis and degradation or release of cellular constituents or products, ion regulation and cell division. It is useful to distinguish between three types of cytotoxicity: (1) basal (or general) cytotoxicity involves one or more of the above-mentioned structures or processes, when all of the cell types studied show similar sensitivities; (2) selective (or cell-specific) cytotoxicity occurs when some types of differentiated cells are more sensitive to the effects of a particular toxicant than others; (3) cell-specific function toxicity occurs when the toxicant affects structures or processes that may not be critical for the affected cells themselves, but which are critical for the organism as a whole (for example, such toxicity can involve effects on cell-to-cell communication).

A large number of in vitro cytotoxicity tests have been developed, employing a variety of cell lines and endpoint measurements. The MTT here proposed is a reduction assay used to determine the level of metabolic activity in eukaryotic cells. It is one of the most common cytotoxicity tests because it is simple, accurate and gives reproducible results. The chemical basis of the assay is the reduction of the MTT, a type of tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. MTT is 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. The reductase activity is highly dependent on the concentration of intracellular NADH and NADPH and the abundance of these nucleotide cofactors is associated with the availability of extracellular glucose. The mitochondrial succinate dehydrogenase and cytochrome c take part in MTT reduction as well. Therefore, any substance or treatment that interferes with these enzymes or with glycolysis, changes the rate of MTT reduction, and consequently alters the result of cell counting. 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 by mixing thoroughly in different organic solvents, mainly alcohols. An increase or decrease in cell number results in a concomitant change in the amount of formazan formed, indicating the degree of cytotoxicity caused by the tested material.



SCOPO

Il saggio MTT è stato condotto allo scopo di valutare il potenziale effetto citotossico di un dispositivo medico su una linea cellulare di fibroblasti L929. L'analisi è stata condotta secondo la normativa ISO per la valutazione biologica dei dispositivi medici UNI EN ISO 10993-5:2009 (E).

AIM

The MTT test was carried out in order to evaluate the potential cytotoxic effect of a medical device on L929 fibroblasts cell line. The analysis was carried out according to ISO normative for the biological evaluation of medical devices UNI EN ISO 10993-5:2009 (E).



MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Colture cellulari

Il monostrato di fibroblasti L929 è altamente rappresentativo del tessuto target in vivo. Le cellule L929 sono state coltivate in MEM (minimal essential medium) supplementato con siero fetale bovino (10%) e glutammina (4 mM) ed incubate in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO₂). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

Cell line and culture conditions

L929 fibroblasts cells monolayers are highly representative of the target tissue in vivo. L929 cells were cultured in MEM (minimal essential medium) supplemented with fetal bovine serum (10%) and glutamine (4 mM) and incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO₂). Good cell culture practices were used.

Campione testato / *Tested sample*

MASCHERINA ADULTI CON STAMPA (REF: MSKST)

Preparazione dei campioni

Il campione in esame è stato incubato overnight a condizioni standard in terreno di coltura. Le cellule sono state trattate con il liquido di cessione così ottenuto e successive diluizioni (1:2) in terreno di coltura. La stessa procedura è stata applicata anche per il riferimento negativo (standard interno), mentre il controllo positivo (SDS) è stato testato alle concentrazioni comprese tra 0.00313 e 0.4 mg/ml.

Samples preparation

The tested sample was incubated overnight at standard conditions in culture medium. Cells were treated with the liquid of maceration obtained in this way and subsequent dilutions (1:2) in culture medium. The same procedure was used for the negative reference (internal standard), while the positive control (SDS) was tested at concentrations between 0.00313 and 0.4 mg/ml.

Esecuzione del test

Un adeguato numero di cellule è stato seminato in piastre da 96 pozzetti. Una volta raggiunto un monostrato semiconfluente, le cellule sono state trattate con le diverse concentrazioni del campione testato e degli standard ed incubate per 24 ore a condizioni standard. Cellule non trattate e mantenute in terreno di coltura rappresentano i controlli negativi. Dopo 24 ore di contatto le piastre sono state esaminate al microscopio a contrasto di fase, il terreno è stato delicatamente rimosso da ciascun pozzetto, le cellule sono state quindi trattate con MTT (1 mg/ml) ed incubate per 3 ore a condizioni standard. Al termine di questo periodo la soluzione di MTT è stata eliminata ed in ciascuno pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di isopropanolo per sciogliere i cristalli di formazano formati. L'assorbanza (densità ottica, OD) è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Test execution

A suitable number of cells was seeded in 96 wells plates. Once a half-confluent monolayer has been reached, the cells were treated with the different dilutions of the tested sample or of the standards and incubated for 24 hours at standard culture conditions. Not treated cells maintained in culture medium are negative controls. After a 24 hours-period contact, the plates were examined under a phase contrast microscope, the culture medium was carefully removed from each well and the cells were treated with MTT (1 mg/ml) and incubated for 3 hours at standard culture conditions. After this period, the solution of MTT was discarded and 100 µl of isopropanol were added in each well in order to dissolve the formazan crystals. The absorbance (optical density, OD) was determined spectrophotometrically at 540 nm wavelength.

RISULTATI

RESULTS

Interpretazione dei risultati per il controllo negativo

L'inibizione della vitalità cellulare ad ogni concentrazione testata è stata espressa come percentuale rispetto al controllo negativo (cellule non trattate) secondo la seguente formula

$$\text{Inibizione \%} = 100 - [(OD_x / OD_{NC}) \times 100]$$

OD_x Densità ottica media delle cellule trattate con il campione in esame alla concentrazione X
OD_{NC} Densità ottica media dei controlli negativi

I valori così calcolati sono stati messi in grafico contro le concentrazioni stesse. Le curve concentrazione-risposta ottenute permettono di estrapolare sia per i campioni che per gli standard il valore di IC50 teorico. **Il valore IC50 indica la concentrazione del composto testato necessaria per inibire la vitalità cellulare del 50%. IC50 è un parametro che consente di valutare la citotossicità di un composto secondo lo schema seguente:**

Interpretation of results for negative control

The inhibition of cell viability at each tested concentration is expressed as percentage of negative control (not treated cells) according to the following formula

$$\text{Inhibition \%} = 100 - [(OD_x / OD_{NC}) \times 100]$$

OD_x Mean optical density of cells treated with test sample at X concentration
OD_{NC} Mean optical density of negative control

*The calculated values are plotted against the concentrations. The concentration-response curves for both standards and tested product allow to extrapolate the theoretical IC50 value (Inhibiting Concentration 50). **The IC50 value is the concentration of test compound which inhibits cell growth/survival by 50%. IC50 is a parameter that allows to evaluate the cytotoxicity of a compound according to the following scheme:***

Valore di IC50 <i>IC50 value</i>	Interpretazione <i>Interpretation</i>
IC50 ≤ 0.5 mg/ml	Effetto citotossico <i>Cytotoxic effect</i>
IC50 > 0.5 mg/ml	Assenza di effetto citotossico <i>Absence of cytotoxic effect</i>

Interpretazione dei risultati per il campione

La vitalità cellulare ad ogni concentrazione testata è espressa come percentuale rispetto al controllo negativo (cellule non trattate) secondo la seguente formula

$$\text{Vitalità \%} = (\text{OD}_x / \text{OD}_{\text{NC}}) \times 100$$

OD_x Densità ottica media delle cellule trattate con il campione in esame alla concentrazione X

OD_{NC} Densità ottica media dei controlli negativi

La vitalità cellulare è un parametro che consente di valutare il potenziale citotossico del dispositivo medico secondo lo schema seguente:

Interpretation of results for tested sample

Cell viability at each tested concentration is expressed as percentage of negative control (not treated cells) according to the following formula

$$\text{Viability \%} = (\text{OD}_x / \text{OD}_{\text{NC}}) \times 100$$

OD_x Mean optical density of cells treated with test sample at X concentration

OD_{NC} Mean optical density of negative control

Cell viability is a parameter that allows to assess the cytotoxic potential of the medical device according to the following scheme:

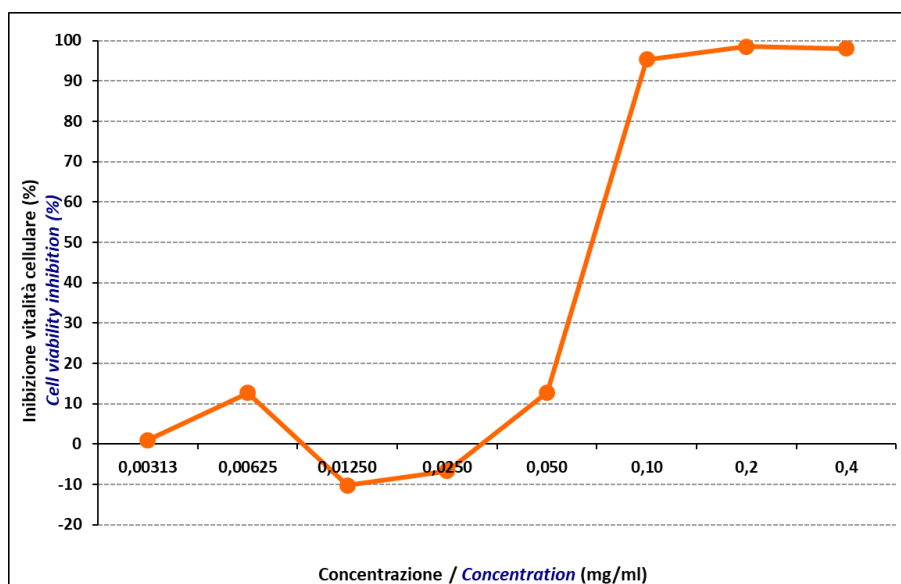
Vitalità cellulare (%) <i>Cell viability (%)</i>	Interpretazione <i>Interpretation</i>
< 70%	Potenziale effetto citotossico <i>Cytotoxic potential</i>
≥ 70%	Assenza di effetto citotossico <i>Absence of cytotoxic potential</i>

Curva concentrazione-risposta di SDS (controllo positivo)

Concentration-response curve for SDS (positive control)

Concentrazione (mg/ml) <i>Concentration (mg/ml)</i>	Inibizione della vitalità cellulare (%) <i>Inhibition of cell viability (%)</i>
0.4	98.04
0.2	98.54
0.1	95.37
0.05	12.82
0.025	Assenza di inibizione / <i>No inhibition*</i>
0.0125	
0.00625	
0.00313	
IC50 = 0.066 mg/ml	

* Diminuzione della vitalità cellulare <10% = non significativa / *Decrease of cells viability <10% = insignificant*



Le concentrazioni testate comprese tra 0.05 e 0.4 mg/ml hanno diminuito significativamente la vitalità cellulare. Un valore di IC50 ≤ 0.5 mg/ml indica un effetto citotossico.

Tested concentrations between 0.05 and 0.4 mg/ml have significantly decreased cells viability. An IC50 value ≤ 0.5 mg/ml means cytotoxic effect.

Curva concentrazione-risposta dello standard negativo *Concentration-response curve for negative standard*

Concentrazione (mg/ml) <i>Concentration (mg/ml)</i>	Inibizione della vitalità cellulare (%) <i>Inhibition of cell viability (%)</i>
5.0	Assenza di inibizione / <i>No inhibition*</i>
2.5	
1.25	
0.625	
0.313	
0.156	
0.0781	
0.0391	

* Diminuzione della vitalità cellulare <10% = non significativa / *Decrease of cells viability <10% = insignificant*

Nessuna delle concentrazioni testate ha diminuito significativamente la vitalità cellulare. Un valore di IC50 > 0.5 mg/ml indica assenza di effetto citotossico.

None of the tested concentrations has significantly decreased cells viability. An IC50 value > 0.5 mg/ml means absence of cytotoxic effect.

Effetto sulla vitalità cellulare di / *Effect on cell viability of* MASCHERINA ADULTI CON STAMPA (REF: MSKST)

Concentrazione <i>Concentration</i>	NC	100%	50%	25%	12,50%	6,25%	3,13%	1,56%	0,78%
Media O.D. <i>O.D. Mean</i>	0,783	0,795	0,825	0,699	0,699	0,795	0,805	0,716	0,794
Vitalità (%) <i>Viability (%)</i>	100,00	101,55	105,56	104,10	88,65	101,51	102,93	90,95	101,37

La vitalità delle cellule trattate con l'estratto tal quale (liquido di cessione al 100%) è pari a 101.5%. Una vitalità $\geq 70\%$ indica assenza di potenziale citotossico.

The viability of the cells treated with the extract as it is (liquid of maceration 100%) is 101.5%. A viability $\geq 70\%$ means absence of cytotoxic potential.

CONCLUSIONI

La vitalità cellulare dei fibroblasti trattati con il liquido di cessione (tal quale) del dispositivo medico testato è **101.5%**. Un valore di vitalità cellulare $\geq 70\%$ rispetto al bianco (cellule non trattate), indica che

il dispositivo medico denominato

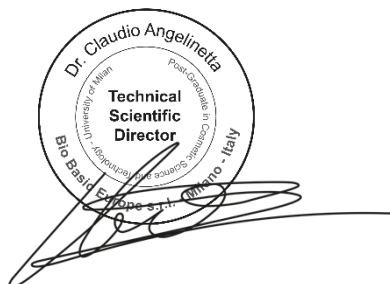
MASCHERINA ADULTI CON STAMPA (REF: MSKST)
è da considerarsi non citotossico

CONCLUSIONS

*Cell viability of fibroblasts treated with liquid of maceration (as it is) obtained from tested medical device is **101.5%**. A cell viability value $\geq 70\%$ of the blank (not treated cells) means that*

the medical device named

MASCHERINA ADULTI CON STAMPA (REF: MSKST)
has not cytotoxic potential



Dr. Claudio Angelinetta
Post-Graduate in Control
Technical Scientific Director
Bio Basic Europe S.r.l. Milano - Italy

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

Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with tmre, jc-1, and nao mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 2002; 47(4): 236–242

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

Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (mtt): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in mtt reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303(2):474–482

Denizot F, Lang RJ. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Immunol Methods* 1986; 89(2): 271-7

Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods* 1990; 131(2): 165-72

Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94 (1-2): 57-63

Kupcsik L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 13-9

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55–63

Seibert H, Balls M, Fentem JH, Bianchi V, Clothier RH, Dierickx PJ, Ekwall B, Garle MJ, Gumez-Lechun MJ, Gribaldo L, Iden M, Kiebsch M, Rasmussen E, Roguet R, Shrivastava R, Walum E. Acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. The report and recommendations of ECVAM workshop 16. *ATLA* 1996; 24: 499-510.

Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. iii. points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 1963; 77: 383–393

Spinner DM. MTT growth assays in ovarian cancer. *Methods Mol Med* 2001; 39: 175-7