



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITA' ***Cytotoxicity Evaluation***

Secondo la norma UNI EN ISO 10993-5 modificata
According to the UNI EN ISO 10993-5 modified standard

COMMITTENTE/CUSTOMER	Chase Life Extension Foundation Ltd 64 Stapleford Cres, Browns Bay 0630 Auckland () - New Zealand
CAMPIONE/SAMPLE	TA Serum 818 Lotto/Batch: F7NCT/200114
DATA RAPPORTO/REPORT DATE	03/02/2014
PROTOCOLLO N./REPORT N.	REL/0147/2014/CITO/ELB

Pagina 1 di 16
REL/0147/2014/CITO/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev. 03

www.abich.it

**Direzione, uffici e
laboratorio analisi:**
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

**Centro studi clinici e
cosmetologici:**
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Premessa/Preliminary

Questo rapporto contiene i dati sperimentali registrati durante l'esecuzione del test eseguito sul prodotto in oggetto.

I risultati del test sono presentati sotto forma di tabelle e grafici riassuntivi per agevolare l'interpretazione.

La prima parte fornisce informazioni circa il committente, il prodotto testato, il tipo di test, il laboratorio esecutore, le date di inizio e fine studio e l'identità degli sperimentatori.

La seconda parte descrive il protocollo sperimentale.

La terza parte riporta i risultati e le conclusioni.

This report contains the experimental data compiled during the in vitro studies of the test product.

The test results are presented in a concise table format for easy interpretation.

The first part provides information regarding sponsor and test product identifications, assay type, entrusted laboratory, study initiation and completion dates and supervisory personnel.

The second part describes the study design, including materials and procedures.

The test results and conclusions are presented in the third and last part of the report.

Nota/Note:

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto o parti di esso possono essere riprodotti solo con il consenso degli sperimentatori.

The results reported in the present brochure refer only to the tested sample/samples and to the particular experimental conditions hereby described. This report or parts of it can be reproduced only with the experimenters' agreement.

Pagina 2 di 16
REL/0147/2014/CITO/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev. 03

www.abich.it

**Direzione, uffici e
laboratorio analisi:**
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

**Centro studi clinici e
cosmetologici:**
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Sommario/Summary

1	PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION	4
1.1	COMMITTENTE/CUSTOMER	4
1.2	CAMPIONE ANALIZZATO/TESTED MATERIAL	4
1.3	TEST/ASSAY	4
1.4	DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES	4
1.5	DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES	4
1.6	SPERIMENTATORE/EXPERIMENTER	5
1.7	SUPERVISORE SCIENTIFICO/SCIENTIFIC SUPERVISOR	5
2	PARTE SECONDA/PART TWO - PROTOCOLLO SPERIMENTALE/STUDY DESIGN	6
2.1	SCOPO DEL TEST/AIM OF THE TEST	6
2.2	ESECUZIONE DEL TEST/ASSAY PROCEDURES	7
2.2.1	<i>Modelli adottati/Test systems</i>	7
2.2.2	<i>Terreno cellulare/ Cell medium</i>	7
2.2.3	<i>Trattamento ed esposizione /Treatment and exposure</i>	7
2.2.4	<i>Test di vitalità cellulare MTT/MTT cell vitality assay</i>	8
2.2.5	<i>Espressione dei risultati/Expression of results</i>	9
2.2.6	<i>Interpretazione dei risultati/ Results interpretation</i>	10
3	PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS	11
3.1	RISULTATI/RESULTS	11
3.2	CONCLUSIONI/CONCLUSIONS	14
4	BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY	15



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

1 PARTE PRIMA/PART ONE – INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION

1.1 *Committente/Customer*

Chase Life Extension Foundation Ltd
64 Stapleford Cres, Browns Bay
0630 Auckland () - New Zealand

1.2 *Campione Analizzato/Tested Material*

Campione/Sample	Codice interno/ Internal code	Descrizione/Description
TA Serum 818 Lotto/Batch: F7NCT/200114	0824/14-01	gel di colore giallo chiaro opaco / opaque light yellow gel
Sodium lauryl sulfate Controllo positivo/ Positive control	SIGMA Lotto/ Batch: 056K0082	Polvere bianca/ White powder

Il Sodio Lauril Solfato (SLS) è stato aggiunto nell'esperimento come controllo positivo irritante./As an irritant positive control, Sodium Lauryl Sulfate (SLS) has been utilized in the experimental set.

1.3 *Test/Assay*

- Citotossicità attraverso il test MTT: test di sopravvivenza cellulare con cheratinociti umani coltivati in monostrato per la valutazione della biocompatibilità con la pelle e le mucose.
- Cytotoxicity by MTT test : cell survival assay using human keratinocytes in monolayer cultures to assess biocompatibility with skin and mucosae.

1.4 *Date dello Studio/Study Dates*

ABICH S.r.l.
Via 42 Martiri, 213/B – 28924
Verbania - Italy - tel +39 (0)323 586239 fax +39 (0)323 496877

1.5 *Date dello Studio/Study Dates*

Inizio/Start: 29/01/2014
Fine/End: 31/01/2014

Pagina 4 di 16
REL/0147/2014/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

1.6 Sperimentatore/Experimenter

Dr. Clara Sinigaglia – Tecnico di laboratorio biomedico/ Biomedical laboratory technician
ABICH S.r.l.

1.7 Supervisore Scientifico/Scientific Supervisor

Dr. Elena Bocchietto – Biologa specialista in Biotecnologie / Biologist, biotechnology specialist.
ABICH S.r.l.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

2 PARTE SECONDA/PART TWO - PROTOCOLLO SPERIMENTALE/STUDY DESIGN

2.1 Scopo del test/Aim of the test

Scopo del test è valutare la citotossicità di prodotti finiti o di materie prime destinati ad essere applicati sulla cute o sulle mucose secondo quanto descritto nella norma UNI EN ISO 10993-5 relativa alla valutazione biologica dei dispositivi medici.

Il test di citotossicità oggetto di questo studio, è stato effettuato per verificare il potenziale di tossicità del prodotto testato nei confronti del caratteristico tipo cellulare della cute e delle mucose, il cheratinocita.

Il metodo si discosta dalla norma in quanto la nostra linea cellulare non proviene da una banca dati riconosciuta come ATCC, inoltre viene aggiunta la scala di interpretazione dei risultati sulla base dei dati storici acquisiti nel nostro laboratorio. Non essendo il campione un dispositivo medico non è necessario come da norma eseguire la valutazione microbiologica del campione stesso.

La metodica utilizzata è quella dell'MTT, semplice e riproducibile, sviluppata originariamente da Mossman. Il reagente chiave è il 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide o MTT, sostanza che dà un colore giallo in soluzione acquosa. La deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali taglia l'anello tetrazolico, portando alla formazione di cristalli di formazano color viola porpora insolubili in acqua. I cristalli vengono sciolti in isopropanolo e la soluzione viola risultante viene misurata spettrofotometricamente. Un aumento o diminuzione delle cellule vitali ha per risultato un cambiamento concomitante nella quantità di formazano che si forma e che può essere considerato come un indicatore del grado di citotossicità causato dall'esposizione alle sostanze in esame.

Aim of the test is to evaluate the cytotoxicity of finished products or raw materials aimed to be used on the skin or on the mucosae following the UNI EN ISO 10993-5 standard concerning the biological evaluation of medical devices.

The cytotoxicity assay performed in this study was designed to evaluate the cytotoxic potential of the tested product towards the keratinocyte, the main cell component of skin and mucosae.

This method is different from the rule one because we use a cell line keratinocytes that does not standard source as ATCC, furthermore we add an interpretation guideline of results on the bases of historical results obtained in our laboratory. The sample is not a medical device and it is not necessary to do the microbiological evaluation of the sample as describe in the rule.

The MTT assay is simple, accurate and yields reproducible results. This method has been developed originally by Mossman. The key component is (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) or MTT. This product is of yellowish colour in solution. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, leading to the formation of purple crystals which are insoluble in aqueous solutions. The crystals are re-dissolved in isopropanol and the resulting purple solution is measured spectrophotometrically. 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 test material.

Pagina 6 di 16
REL/0147/2014/CITO/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev. 03

www.abich.it

**Direzione, uffici e
laboratorio analisi:**
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

**Centro studi clinici e
cosmetologici:**
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

2.2 Esecuzione del test/Assay procedures

2.2.1 Modelli adottati/Test systems

Il modello cellulare utilizzato per il test in vitro è rappresentato da: *In vitro* test system employed consists of:

cheratinociti umani stabilizzati (cellule HaCaT)/transformed human keratinocytes (HaCaT cell).

La linea cellulare deriva da pelle adulta che mantiene completa capacità di differenziazione epidermica./The cell line has been established from adult skin which maintains full epidermal differentiation capacity.

La linea cellulare utilizzata è rappresentativa del tessuto (cute) a cui verrà in contatto il prodotto. / The employed cell line is representative of the tissue (skin) expected to come in contact with the product.

La linea cellulare è conservata in azoto in presenza di un crioprotettante (dimetilsolfossido) fino al momento dell'uso. / The cell line is stored in nitrose in the presento f a cyoprotectant (dimethylsulfoxide).

2.2.2 Terreno cellulare/ Cell medium

Di seguito riportiamo l'elenco del terreno e i reagenti utilizzati con i relativi lotti./ Hereafter we report the list of the utilized medium and reagents with the batches.

- Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) low Glucose (Euroclone) lotto/batch: EUM0122137
- Pennicillina-Streptomicina / Pennicillin-Streptomycin 0,1mg/ml (Euroclone) lotto/batch: EUM111691
- Gentamicina/ Gentamycin 10mg/ml (Euroclone) lotto/batch: EUM0120070
- Glutamina/ Glutamine 4mM (Euroclone) lotto/batch: EUM0111885
- Fetal Bovin serum (FBS) (Euroclone) lotto/batch: EUS0121927

pH 7,2 - 7,4.

2.2.3 Trattamento ed esposizione /Treatment and exposure

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (30000cellule/pozzetto) e lasciate crescere per 24h a 37°C e 5% CO₂.

Il secondo giorno è stato aggiunto terreno di coltura fresco contenente il prodotto da testare in modo da raggiungere 6 diluizioni finali comprese tra 5 e 0,16mg/ml. Il campione è stato sciolto e successivamente diluito nel terreno di coltura.

Ogni campione è stato testato in triplicato. Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo, e come controllo positivo le cellule sono state trattate con un tensioattivo a tossicità nota (Sodio Lauril Solfato - SLS) disciolto nel terreno di coltura alle concentrazioni comprese tra 0,5mg/ml a 0,03mg/ml.

Al termine dell'incubazione è stato quindi eseguito il test di citotossicità (MTT) per valutare la percentuale di sopravvivenza cellulare. Il test MTT valuta l'impatto tossico della sostanza in questione sulla vitalità cellulare.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

Cells have been seeded in 96 wells plates (30000cells/well) and allowed to grow for 24 h at 37°C and 0,5% CO₂.

The second day fresh medium is added, supplemented with 6 scalar dilutions of the tested product ranging from 5 to 0.16mg/ml.

The sample has been dissolved and diluted in the medium.

The test is carried out in three replica for each test dilution. At the end of the incubation period, cells were tested for their viability by citotoxicity (MTT) assay. Cells treated with a known irritating surfactant (Sodium Lauryl Sulfate – SLS) in concentration ranging from 0.5mg/ml to 0.03mg/ml are used as positive control. Untreated cells are used as negative control. The MTT assay is able to evaluate the toxic impact of the tested compound on the cells viability.

2.2.4 Test di vitalità cellulare MTT/MTT cell vitality assay

Il test MTT è semplice, accurato e fornisce risultati riproducibili. Questo metodo è stato sviluppato originariamente da Mossman. Il reagente chiave è il 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide o MTT, sostanza che dà un colore giallo in soluzione acquosa. La deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali taglia l'anello tetrazolico, portando alla formazione di cristalli di formazano color viola porpora insolubili in acqua. I cristalli vengono sciolti con una soluzione solubilizzante l'MTT.

La soluzione viola risultante viene misurata spettrofotometricamente. Un aumento o diminuzione delle cellule vitali ha per risultato un cambiamento concomitante nella quantità di formazano che si forma e che può essere considerato come un indicatore del grado di citotossicità causato dall'esposizione alle sostanze irritanti.

Dopo 24h di trattamento il terreno di coltura viene aspirato e le cellule incubate in 150 µl/pozzetto di una soluzione 1mg/ml di MTT, per 2h a 37°C. la soluzione viene rimossa e sostituita con 200 µl/pozzetto di isopropanolo con successivi 30' di incubazione a temperatura ambiente e con agitazione a media velocità. I Viene letta l'assorbanza a 550 nm con un colorimetro (Tecan modello Sunrise remote) equipaggiato con un lettore di piastre sottraendo la lettura del fondo a 690 nm. Le assorbanze vengono corrette sottraendo le letture dovute al mezzo diluente.

The MTT assay is simple, accurate and yields reproducible results. This method has been developed originally by Mossman. The key component is (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) or MTT. This product is of yellowish colour in solution. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, leading to the formation of purple crystals which are insoluble in aqueous solutions. The crystals are re-dissolved with the MTT Solubilization Solution and the resulting purple solution is measured spectrophotometrically. 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 test material

After 24h exposure of the cells to the test material, the culture medium is removed and the cells are incubated for 2 h in 150 µl/well of 1mg/ml MTT solution at 37°C. The solution is then removed and replaced with 200 µl/well of isopropanol, with further 30' incubation at room temperature under medium speed shaking.

The absorbance at 550 nm is measured with a microplate reader (Tecan modello Sunrise remote), deducting background at 690 nm. The absorbance values are corrected by subtracting the reading of the blanks, with the diluent only.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

2.2.5 *Espressione dei risultati/Expression of results*

Il risultato è espresso come vitalità cellulare in percentuale secondo la formula:

% di vitalità cellulare = [OD(550 nm - 690 nm) prodotto testato / OD(550 nm - 690 nm) controllo negativo] x 100

Una riduzione della vitalità cellulare > 30% è considerato un effetto citotossico.

In tal caso è possibile calcolare il valore di IC_{50} (*Inhibiting Concentration 50*) che indica la concentrazione di prodotto che inibisce la vitalità cellulare del 50%.

The results are expressed in terms of viability:

% of cell viability = [OD(550 nm - 690 nm) test product / OD(550 nm - 690 nm) negative control] x 100

Reduction of cell viability by more than 30% is considered a cytotoxic effect.

In that case it is possible to calculate the IC_{50} value (*Inhibiting Concentration 50*) which indicates the concentration of test compound which inhibits the cell viability of 50%.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

2.2.6 Interpretazione dei risultati/ Results interpretation

Per prodotti finiti, valori di IC_{50} inferiori a 1mg/ml (o 1 μ l/ml) possono essere considerati come irritanti, valori maggiori di 3mg/ml (o 3 μ l/ml) presentano una buona biocompatibilità. Per detergenti e prodotti da risciacquo, l'eventuale fattore di diluizione deve essere preso in considerazione. Per materie prime bisogna prendere in considerazione la concentrazione d'uso. In tabella vengono riportati i criteri di interpretazione dei risultati:

For finished products, IC_{50} values higher than 1mg/ml (or 1 μ l/ml) may be considered as irritating, values lowest than 3mg/ml (or 3 μ l/ml) show a good biocompatibility. For detergents and rinsing off products, the eventual dilution factor should be taken in account. For raw materials, the use concentration should be taken in account. In the following table criteria for in vitro interpretation are reported:

Valori di IC_{50} / IC_{50} values	Criteri per interpretare i risultati in vitro (prodotti finiti) Criteria for in vitro interpretation (finished products)
> 5mg/ml	Ottima biocompatibilità-non citotossico Very good biocompatibility-not cytotoxic
3-5 mg/ml	Buona biocompatibilità-moderata citotossicità alla concentrazione più elevata Good biocompatibility-moderate cytotoxicity at the highest concentration
1-3 mg/ml	Modesta biocompatibilità-elevata citotossicità alla concentrazione più elevata Feeble biocompatibility- high cytotoxicity at the highest concentration
< 1mg/ml	Scarsa biocompatibilità/elevata citotossicità a più concentrazioni Poor biocompatibility- high cytotoxicity at more than one concentration

La scala di interpretazione dei valori di IC_{50} si basa sui risultati storici acquisiti nel nostro laboratorio in associazione con quelli del controllo positivo (SLS) per il quale sono disponibili i dati *in vivo*, oltre che sulla letteratura scientifica disponibile e citata (2,3,4)/The interpretation range of IC_{50} values is based on historical results obtained in our laboratory in combination with data related to the positive control (SLS) for which *in vivo* data are available and on the available scientific literature as cited in the bibliography (2,3,4).



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

3 PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS

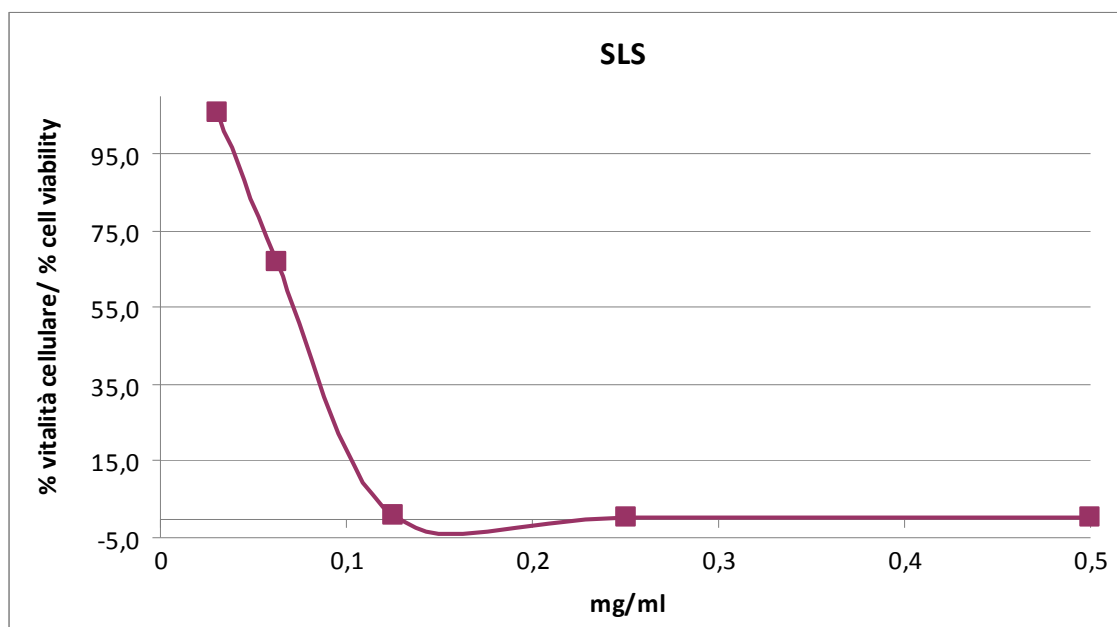
3.1 *Risultati/Results*

SLS (controllo positivo/positive control)					
Dose mg/ml	0,50	0,25	0,125	0,0625	0,03125
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo)/ % cell viability (vs negative control)	0,5	0,5	1,0	67,0	105,5
stand. dev.	0,2	0,3	0,1	5,5	7,1

$IC_{50} = 0,09\text{mg/ml}$

Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime quattro diluizioni testate.

A mortality cell > 30% is pointed out at the first four tested dilutions.



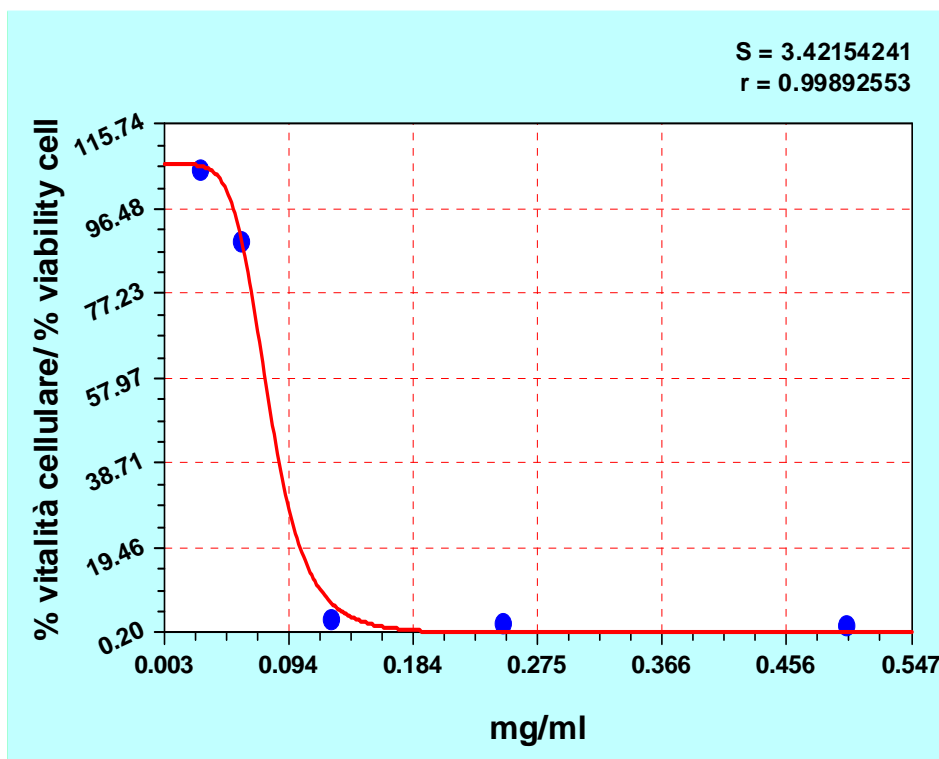
**Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di SLS/
Cell vitality expression after treatment with increasing amount of SLS**

Pagina 11 di 16
REL/0147/2014/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



Curva di regressione per il calcolo dell'IC₅₀/Regression plot to calculate the IC₅₀ dose



ABICH S.r.l.

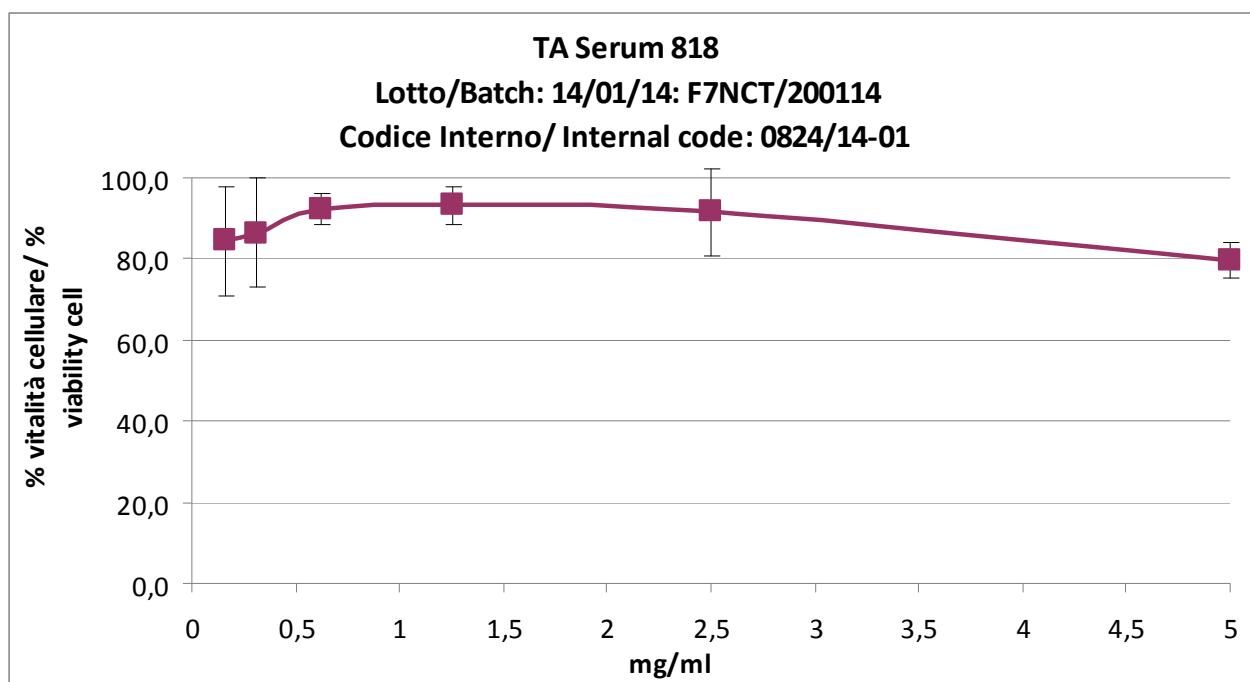
Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

TA Serum 818						
Lotto/Batch: F7NCT/200114						
Codice interno/internal code: 0824/14-01						
Dose mg/ml	5,00	2,50	1,25	0,625	0,3125	0,15625
Vitalità cellulare % (rispetto al controllo negativo)/% cell viability (vs negative control)	79,7	91,7	93,2	92,4	86,4	84,4
stand. dev.	4,2	10,7	4,7	4,0	13,4	13,3

$IC_{50} > 5 \text{ mg/ml}$

Non viene evidenziata mortalità cellulare significativa alle concentrazioni testate

Any significant cell mortality is pointed out at all tested concentrations.



**Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con diverse diluizioni del prodotto testato/
Cell vitality expression after treatment with different dilutions of the tested product**

Pagina 13 di 16
REL/0147/2014/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

3.2 Conclusioni/Conclusions

Sulla base dei risultati sopra riportati il prodotto/On the bases of the results here shown, the product:

TA Serum 818 Lotto/Batch: F7NCT/200114

5,00 mg/ml	Non citotossico/ Not cytotoxic
2,50 mg/ml	Non citotossico/ Not cytotoxic
1,25 mg/ml	Non citotossico/ Not cytotoxic
0,63 mg/ml	Non citotossico/ Not cytotoxic
0,31 mg/ml	Non citotossico/ Not cytotoxic
0,16 mg/ml	Non citotossico/ Not cytotoxic

non ha causato effetti citotossici alle concentrazioni testate su cheratinociti umani.

Questo è indice di assenza di potenziale citotossico significativo per la cute.

Il prodotto mostra **un'ottima biocompatibilità nei confronti della cute integra.**

did not cause cytotoxic effects at all tested concentrations on human keratinocytes.

It may be considered as **not cytotoxic.**

The product shows **a very good biocompatibility towards the healthy skin.**

Data/Date: 03/02/2014

Il Direttore dello studio/ Study Director
Dr. Elena Bocchietto

Pagina 14 di 16
REL/0147/2014/CITO/ELB

AZIENDA CERTIFICATA
UNI EN ISO 9001:2008
Certificato N. 501004992 – Rev. 03

www.abich.it

**Direzione, uffici e
laboratorio analisi:**
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
Tel +39 0323 586239/496041
Fax +39 0323 496877
e-mail: info@abich.it

**Centro studi clinici e
cosmetologici:**
Via Bruno Buozzi, 4
20090 – Vimodrone (MI) Italia

Sede legale:
Via 42 Martiri, 213/B
28924 – Verbania (VB) Italia
CF/P.IVA/Reg. Imp. VCO: 01864020035
R.E.A.: 189901
Cap. Soc. € 16.000,00 i.v.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

4 BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY

1. Norma UNI EN ISO 10993-5 Valutazione biologica dei dispositivi medici/ biological evaluation of medical devices – Prove per la citotossicità in vitro/ assays for the in vitro cytotoxicity- Settembre 2009.
2. Hans Torma, Magnus Lindberg and Berit Berne (2008). Skin Barrier Disruption by Sodium Lauryl Sulfate-Exposure Alters the Expressions of Involucrin, Transglutaminase 1, Profilaggrin, and Kallikreins during the Repair Phase in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology* **128**: 1212–1219.
3. J.W. Fluhr, A. Bornkessel, A. Akengin, S. Fuchs, J. Norgauer, P. Kleesz, R. Grieshaber and P. Elsner. (2005). Sequential application of cold and sodium lauryl sulphate decreases irritation and barrier disruption in vivo in humans. *British Journal of Dermatology* **152**: 702–708.
4. D.G.Koopman, S.Kezic and M.M.Verberk. (2004). Skin reaction and recovery: a repeated sodium lauryl sulphate patch test vs. a 24-h patch test and tape stripping. *British Journal of Dermatology*. **150**: 493–499.
5. Smith HR, Armstrong DK, Holloway D, Whittam L, Basketter DA, McFadden JP.(2002). Skin irritation thresholds in hairdressers: implications for the development of hand dermatitis. *Br J Dermatol*. **146(5)**:849-52.
6. Jürgen Fuchs, Norbert Groth and Thomas Herrling. (2000). In vitro and in vivo assessment of the irritation potential of different spin traps in human skin. *Toxicology*. **151**: 55-63.
7. Losio N. et al. In vitro product safety evaluation: a cytotoxicity study on oral care formulations containing usnic acid, a natural anti-microbial agent extracted from tree lichen, 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Bologna, 29 Agosto-2 settembre 1999.
8. Botham P.A., Earl L.K., Fentem J.H., Roguet R., van deSandt J.J.M. (1998) Alternative methods for skin irritation testing: the current status. *ATLA* **26**: 195-211.
9. Ohno T., Futamura Y., Harihara A., Hatao M., Hayasaka A. (1998) Validation study on five cytotoxicity assays by JSAE- VIII. Details of the neutral red uptake assay. *Alternatives to animal testing and experimentation*, **5**:131-145.
10. Lawrence, J.N., Dickson, F.M. and Benford, D.J. (1997). Skin irritant-induced cytotoxicity and prostaglandin E₂ release in human skin keratinocyte cultures. *Toxicology in Vitro* **11**: 627-631.
11. Tsutsui, T., Tanaka, Y., Ushimura, A., Ide, T., Matsumura, M. and Barrett, J.C. (1997). In vitro cytotoxicity of diverse preparations used in dental practice to human gingival keratinocytes. *Toxicology in Vitro* **11**: 393-398.
12. Seibert, H., Balls, M., Fentem, J.H., Bianchi, V., Fabricier, R.H., Dierickx, P.J., Ekwall, B., Garle, M.J., Gómez-Lechón, M.J., Gribaldo, L., Gulden, M., Liebsch, M., Rasmussen, E., Roguet, R., Shivrastava, R. and Walum, E. (1996). Acute toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. *ATLA* **24**:499-510.
13. C. Faller Evaluation of two in vitro test batteries for the assessment of eye irritation potential of cosmetics - *ATLA* **24**: 250 (1996) poster abstract.
14. M Balls et al. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test, *Toxicology in vitro* **9** (1995) : 871-929

Pagina 15 di 16
REL/0147/2014/CITO/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi

15. F. Sina et al. A collaborative evaluation of seven alternatives to Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundamental and applied toxicology* 26 (1995) :20-31.
16. Wilhelm KP, Cua AB, Wolff HH, Maibach HI. (1993). Surfactant-induced stratum corneum hydration in vivo: prediction of the irritation potential of anionic surfactants. *J Invest Dermatol.* **101(3)**:310-5.
17. Mossman, T. (1993). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55-63.
18. Klaus-P Wilhelm, Christian Surber and Howard I. Maibach. (1991) Effect of sodium lauryl sulphate-induced skin irritation on in vivo percutaneous penetration of four drugs. *The Society for Investigative Dermatology.* **97** (5) 927-932.
19. Kupper, T.S. (1990). Immune and inflammatory processes in cutaneous tissue: mechanisms and speculations. *J. Clin. Invest.* **86**:1783-1789.
20. Borenfreund, E. and Puerner, J. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**:119-124J