



**VALUTAZIONE IN VITRO**  
**DELLA FUNZIONALITA' ANTI-INVECCHIAMENTO DI PRODOTTI FINITI**  
**COSMETICI ATTRAVERSO LO STUDIO DELL'AZIONE ANTIOSSIDANTE E**  
**PROTETTIVA NEI CONFRONTI DELL'UVA IN COLTURE CELLULARI DI**  
**CHERATINOCITI UMANI.**

*In vitro Evaluation of the anti-ageing activity of cosmetic products through the investigation of their anti-oxidant and protecting activity against UVA on human keratinocytes cell cultures.*

<b>CUSTOMER/COMMITTENTE</b>	<b>Laboratoire Dr Paul et Karin Herzog SA Rte du Montéliza, 37-39 1806 St-Légier Vd</b>
<b>PRODUCT/PRODOTTO</b>	<b>Karin Herzog Vita-A-Kombi 2 Day &amp; Night Face Cream</b>
<b>REPORT DATE/DATA RAPPORTO</b>	<b>19/09/2006</b>
<b>REPORT N./PROTOCOLLO N.</b>	<b>REL/379/06/FUNZ/ELB</b>



Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## Premessa/Preliminary

Questo rapporto contiene i dati sperimentali registrati durante l'esecuzione del test di efficacia eseguito sui prodotti 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, i prodotti testati, 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.

Questo studio è stato condotto in stretta osservanza delle norme di Buona Pratica di Laboratorio (GLP).

This report contains the experimental data compiled during the *in vitro* effectiveness evaluation studies of the tested products.

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 are presented in the third and last part of the report.

The present study was carried out in strict compliance to *Good Laboratory Practice* (GLP) guidelines.

## 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.



Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

## Sommario/Contents

<b>1</b>	<b><u>PARTE PRIMA/PART ONE</u> - INFORMAZIONI/INFORMATION</b>	<b>4</b>
1.1	COMMITTENTE/CUSTOMER	4
1.2	CAMPIONI TESTATI/TESTED SAMPLES	4
1.3	TEST ESEGUITI/EXECUTED TESTS	4
1.4	LABORATORIO INCARICATO/ENTRUSTED LABORATORY	4
1.5	DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES	5
1.6	SPERIMENTATORE/EXPERIMENTER	5
1.7	SUPERVISORE SCIENTIFICO/SCIENTIFIC SUPERVISOR	5
<b>2</b>	<b><u>PARTE SECONDA/PART TWO</u> - PROTOCOLLO SPERIMENTALE/STUDY DESIGN</b>	<b>6</b>
2.1	INTRODUZIONE E SCOPO DEL TEST/INTRODUCTION AND AIM OF THE TEST	6
2.2	ESECUZIONE DEI TEST/ASSAY PROCEDURES:	7
2.2.1	<i>Modello cellulare adottati/Cell model:</i>	7
2.2.2	<i>Trattamento ed esposizione/Treatments and exposures</i>	7
2.2.3	<i>Dosaggio dei ROS/ROS dosage</i>	8
2.2.4	<i>Test di citotossicità NRU/The NRU cytotoxicity assay</i>	8
<b>3</b>	<b><u>PARTE TERZA/PART THREE</u> - RISULTATI/RESULTS</b>	<b>10</b>
3.1	ANALISI DEI ROS/ROS ANALYSIS	10
3.2	VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE SU CHERATINOCITI UMANI CON E SENZA ESPOSIZIONE UVA/ CELL VIABILITY EVALUATION ON KERATINOCYTES BEFORE AND AFTER UVA EXPOSURE	12
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONI/CONCLUSIONS</b>	<b>13</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY</b>	<b>14</b>



## 1 Parte prima/Part One - Informazioni/Information

### 1.1 *Committente/Customer*

Laboratoire Dr Paul et Karin Herzog SA  
Rte du Montéliza, 37-39  
1806 St-Légier Vd

### 1.2 *Campioni testati/Tested samples*

Nome/Name	Descrizione/Description
Karin Herzog Vita-A-Kombi 2 Day & Night Face Cream Codice interno/Inside code 324/06-05	Emulsione biancastra/ Whitish emulsion

In aggiunta un controllo positivo (antiossidante noto) è stato aggiunto nell'esperimento:

In addition, a **positive controls** (well known antioxidant) has been included in the experimental set:

- Vitamina C

### 1.3 *Test eseguiti/Executed tests*

- ❖ Misura dei ROS prodotti dopo stress ossidativo con UVA su cheratinociti umani, in presenza ed in assenza del prodotto da testare.
- ❖ ROS measure on keratinocytes after exposure to UVA, with and without the tested product.
- ❖ Protezione della vitalità dopo stress ossidativo UVA valutata tramite il test NRU su cellule di cheratinociti umani coltivate in monostrato in presenza o meno del prodotto da testare per la valutazione della sopravvivenza cellulare.
- ❖ Vitality protection after UVA stress by NRU test: cell survival assay using cultured human keratinocytes in monostratum cultures with and without the tested product.

### 1.4 *Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Ente Sanitario di Diritto Pubblico)  
Laboratorio Ricerca applicata ai Substrati Cellulari. Via Bianchi,  
7/9 - 25100 Brescia – ITALY



Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

### **1.5 Date dello studio/Study dates**

Inizio/Initiation: 04/09/2006

Fine /completion: 06/09/2006

### **1.6 Sperimentatore/Experimenter**

Dr. Marina Nadia Losio – Ricercatore/Researcher at  
IZSLER Centro Ricerca Applicata ai Substrati cellulari  
Via Bianchi, 7/9 - 25100 Brescia - ITALY

### **1.7 Supervisore scientifico/Scientific supervisor**

Dr. Elena Bocchietto –Biologa specializzata in Biotecnologie -  
biologist specialist in  
biotechnology – ABICH S.r.l. - Laboratorio Analisi Biologiche  
e chimiche - Via delle Industrie 29/2 – 28924 Verbania ITALY  
Tel +39 (0)323 586239 fax +39(0)323 496877





## 2 PARTE SECONDA/Part TWO - Protocollo sperimentale/Study Design

### 2.1 Introduzione e scopo del test/Introduction and aim of the test

I metodi *in vitro* di valutazione dell'attività antiossidante rivestono un grande interesse per dimostrare l'efficacia e la stabilità di prodotti finiti o ingredienti cosmetici anti-invecchiamento, protettivi e rigeneranti della cute. Secondo la normativa europea corrente (Basic Council Directive N° 76/768/ EEC of the 27/07/76, EC L. 262 of the 27/09/1976; VI Amendment Council Directive 93/35 EEC of the 14/06/1993 ECL.151 of the 23/06/1993) i responsabili dell'immissione sul mercato di prodotti finiti devono supportare adeguatamente le proprietà attribuite al prodotto. Una delle principali proprietà vantate dai prodotti anti-età è la loro capacità di contrastare gli effetti negativi legati allo stress ossidativo ed al rilascio di radicali liberi (ROS) nella cute.

Lo stress ossidativo è una delle principali cause di invecchiamento biologico ed è coinvolto nello sviluppo di molte patologie cutanee, dalle dermatiti ai melanomi. L'esposizione a raggi UV, a sostanze inquinanti, al fumo così come l'assunzione di alimenti, di farmaci o situazioni patologiche possono aumentare il contenuto di sostanze ossidanti nella cute, o ridurre l'efficienza degli antiossidanti endogeni.

L'esposizione a stress ossidativo porta alla formazione di ROS che a loro volta causano danni alle membrane cellulari (perossidazione lipidica), così come alle strutture proteiche ed al Dna, fino ad arrivare alla morte della cellula. Sostanze antiossidanti come le vitamine A, E e C, sono spesso aggiunte ai prodotti cosmetici per contrastare i processi ossidativi nelle cellule cutanee e ritardare l'invecchiamento.

Lo scopo di questo studio è di investigare la potenzialità antiossidante di prodotti finiti cosmetici, provocando artificialmente un danno da stress ossidativo tramite esposizione ad UVA in colture cellulari di cheratinociti, in presenza o meno di diverse concentrazioni dei campioni indagati. Come controllo positivo viene utilizzato un agente antiossidante noto come la vitamina C.

Le cellule utilizzate sono colture di cheratinociti umani di tipo primario, provenienti da biopsie di donatori sani. In un primo test, vengono analizzate l'espressione di ROS indotta da UVA e la sua inibizione ad opera dei composti in questione, come indicatore di efficacia anti-scavenger. Nel secondo test viene valutata la vitalità delle cellule con e senza l'esposizione ai prodotti e agli UVA.

*In vitro* methods to evaluate anti-oxidant, regenerating and anti-age properties of cosmetic products are of great interest to assess their protective effectiveness and stability. The current European cosmetic rules ask the manufacturers to prove the effectiveness they claim for their product (Basic Council Directive N° 76/768/ EEC of the 27/07/76, EC L. 262 of the 27/09/1976; VI Amendment Council Directive 93/35 EEC of the 14/06/1993 ECL.151 of the 23/06/1993). One of the main claim for anti-aging and protective cosmetics is their activity in counteracting oxidative stress and free-radicals release in the skin.

Oxidative stress is one of the main cause of aging process and is involved in the development of many serious human diseases. Exposure to UVA rays, pollutants, tobacco's smoke, as well as diet, drugs intake or pathologies can increase the level of oxidant activity in the skin cells or decrease the effectiveness of endogenous antioxidant systems.

Following exposure to oxidative stress Reactive Oxygen Species (ROS) formation, damages to the cells membrane and to DNA may occur in the cell, leading to cell transformation or even death. Anti-oxidant molecules such as vitamin A, C and E are often added to topical products to counteract the negative effect of oxidative stress and delay the cell aging process.





Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

In the present study, we investigated the effectiveness of the tested products to counteract oxidative damages artificially induced by UVA on skin-derived keratinocytes.

The cells are exposed to a photoinduced (UVA) oxidative stress with and without the investigated products at different percentages, in order to evaluate their ability to neutralize the oxidative stress-induced damages. We investigated ROS formation and its inhibition as a direct indicator of the anti-scavenger activity. Furthermore the cell vitality is assayed through the NRU method, with and without exposure to the tested substances and UVA rays. We used Vitamin C as a well known antioxidant agent for positive control.

## 2.2 Esecuzione dei test/Assay procedures:

### 2.2.1 Modello cellulare adottati/Cell model:

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

*cheratinociti umani in colture monostrato/Human primary keratinocytes in monolayer cultures.*

I cheratinociti primari umani provengono da biopsie di cute pediatriche, ottenute con il permesso del comitato etico da operazioni chirurgiche di routine. L'epidermide è separata dal derma tramite incubazione con dispasi e trattamento con tripsina per creare una sospensione di singole cellule. I cheratinociti sono stati coltivati in Dulbecco's modified Eagle's and Ham's F12 media (3:1) arricchito con 10% FCS (W/v) e con specifici supplementi.

Human primary keratinocytes come from paediatric foreskins, with ethic committees permission, from pre-planned routine surgery. The epidermis was separated from dermis by incubation with dispase for three and trypsinized to generate single cell suspension.

Keratinocytes were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's and Ham's F12 media (3:1) enriched with 10% fetal calf serum (v/v) and specific enrichments.

### 2.2.2 Trattamento ed esposizione/Treatments and exposures

In questo studio le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti a 25.000 cellule/pozzetto e lasciate crescere per 24 h, fino a semiconfluenza. Quindi è stato aggiunto terreno di coltura fresco contenente il prodotto da testare in modo da raggiungere varie diluizioni finali tra 2,5 e 0,003 mg/ml. L'esposizione al campione da testare ed al controllo viene protratta per ulteriori 16 ore. Ogni campione è stato testato in triplicato e gli esperimenti sono stati ripetuti due volte.

Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo, e cellule trattate con vitamina C 0,15 mg/ml sono state utilizzate come controllo positivo.

Terminato il pretrattamento, è stato eliminato il terreno contenente il campione e le cellule sono state quindi in parte controllate per la vitalità con il test NRU e in parte esposte ad UVA per 5', 10' e 15' a 1,7mW/cm<sup>2</sup>. Al termine dello stress sono stati dosati i ROS prodotti nel surnatante di coltura e di nuovo la vitalità cellulare con NRU sulle cellule irradiate.





These cells multiply in culture until a cell monolayer is reached. In this study, the cells were seeded in 96-well plates and semi-confluency (25.000 cells/well) was reached in 24 hours. Once a confluence of 60-70% has been reached, fresh medium is added with scalar dilutions of the tested products.

Non treated cells are used as negative controls. At this stage the cell cultures were treated with different dilutions of the test compound and of the controls to obtain final concentrations ranging from 2,5 to 0,003 mg/ml. For each dilution, 3 replicate tests were performed and repeated twice. The product was dissolved in the culture medium. 0,15 mg/ml Vitamin C is added separately as positive control. Part of the cells were checked for their vitality with the NRU assay. The remaining cells were then exposed to a 5', 10' and 15' UVA irradiation with 1,7mW/cm<sup>2</sup>.

At the end of the exposure period, the ROS formation is investigated in the cell supernatant. The cell vitality is determined after 15' of UVA exposure and without UV exposure.

### 2.2.3 Dosaggio dei ROS/ROS dosage

Dopo aver esposto le cellule al prodotto da testare, il terreno di coltura è stato rimosso, le cellule lavate in PBS e quindi ad ogni pozzetto è stato aggiunto un tampone contenente diclorofluoresceina acetato (DCA). La DCA reagisce con i radicali liberi eventualmente presenti dando origine a un derivato fluorescente e la lettura in fluorimetria permette di avere quindi un dato quantitativo correlato alla presenza di queste sostanze nelle cellule analizzate.

Dopo l'incubazione, la soluzione di DCA è stata quindi eliminata e le cellule sono state quindi esposte a radiazioni UVA per diversi tempi, e subito dopo è stata letta la fluorescenza. La lettura al fluorimetro viene eseguita come descritto nella metodica nm direttamente sulle piastre (Kanthasamy et al. 1997).

After having exposed the cells to the tested product, the cell culture medium is removed and the cells are washed in PBS. The Dichlorofluorescein acetate (DCA) solution is added to each well. DCA is reacting with free radicals in the medium, originating a fluorescent derivative and the fluorimeter reading allows to obtain a quantitative data related to the ROS content in the cells.

After suitable incubation, the DCA solution has been discharged and the cells have then be exposed for different times to UVA irradiation and soon after read in the fluorimeter, as described (Toxicol. Letters 1997 - 93 : 47-54).

### 2.2.4 Test di citotossicità NRU/The NRU cytotoxicity assay

Il test NRU è un metodo chemio-sensibile per la vitalità cellulare, basato sull'abilità delle cellule vive di incorporare e legare il Rosso Neutro (RN), un colorante vitale. Il RN è un debole colorante cationico che penetra la membrana cellulare per diffusione non ionica e si accumula nei lisosomi dove si lega nei siti anionici della matrice. Alterazioni della superficie cellulare o della sensibilità della membrana lisosomiale portano alla fragilità del lisosoma e ad altri cambiamenti che gradualmente diventano irreversibili.

Questi cambiamenti dovuti all'azione di xenobiotici portano ad una diminuzione dell' "uptake" e del legame del RN. Con questo metodo è possibile distinguere tra cellule vive, danneggiate o morte.

Dopo l'incubazione, si sostituisce il terreno con terreno fresco più NRU, le cellule vengono incubate a 37 °C per 4h. Quindi vengono sottoposte a diversi lavaggi per eliminare i residui di colorante in eccesso e sottoposte a lettura colorimetrica.





**ABICH**  
GRUPPO biolab

Analisi Biologiche e Chimiche  
Tossicologia, Ricerche e Servizi



I. Z. S. DELLA LOMBARDIA E  
DELL'EMILIA-ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

REPARTO RICERCA APPLICATA AI SUBSTRATI  
CELLULARI

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613

Il risultato è espresso come:

$$\% \text{ sopravvivenza cellulare} = \frac{\text{OD cellule trattate} \times 100}{\text{OD cellule non trattate}}$$

The NRU assay is based on the cell ability to incorporate and bind the Neutral Red (NR), a vital dye. The NR is a weak cationic dye that penetrates the cell membrane through a mechanism of non ionic diffusion and that is accumulated in the lysosomes, on matrix anionic sites. Cell and lysosome membrane alterations cause lysosomes fragility and gradual irreversible changes in the cells. These changes induced by xenobiotics determinate the decrease of NR uptake and of its linkage to lysosomes. This method is able to discriminate alive, damaged or dead cells. Cells are incubated with scalar concentrations of the products and with the Neutral Red solution (NR). If the membrane is damaged, it releases the dye in the medium.

After incubation, the medium is replaced with fresh medium + NR medium and cells are incubated for 4 h at 37°C. Then cells are washed more times to eliminate exceeding dye wastes and read at the colorimeter.

The results are expressed in terms of viability:

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD treated cells} \times 100}{\text{OD untreated control cells}}$$

### 3 PARTE TERZA/PART THREE - Risultati/Results

#### 3.1 *Analisi dei ROS/ROS analysis*

In questo test si è evidenziato come il campione, testato a concentrazioni comprese tra 2,5 e 0,003 mg/ml riduca la produzione di ROS conseguente a trattamento con UVA di diversa intensità solo alla concentrazione più alta testata. L'effetto più elevato (-45%) si riscontra con lo stress ossidativo di 5'. Questa concentrazione ha mostrato anche un debole effetto citotossico, per cui in parte la riduzione dei ROS è legata alla presenza di un minore numero di cellule.

In this test we pointed out as the sample, tested at concentrations between 2,5 and 0,003 mg/ml, is able to reduce the ROS production following photo-oxidative stress only at the highest tested concentration. The highest effect (-45%) is detected with the '5 stress. A slight cytotoxic effect has been pointed out at this concentration, so the ROS reduction should be partly due to the reduced number of cells.

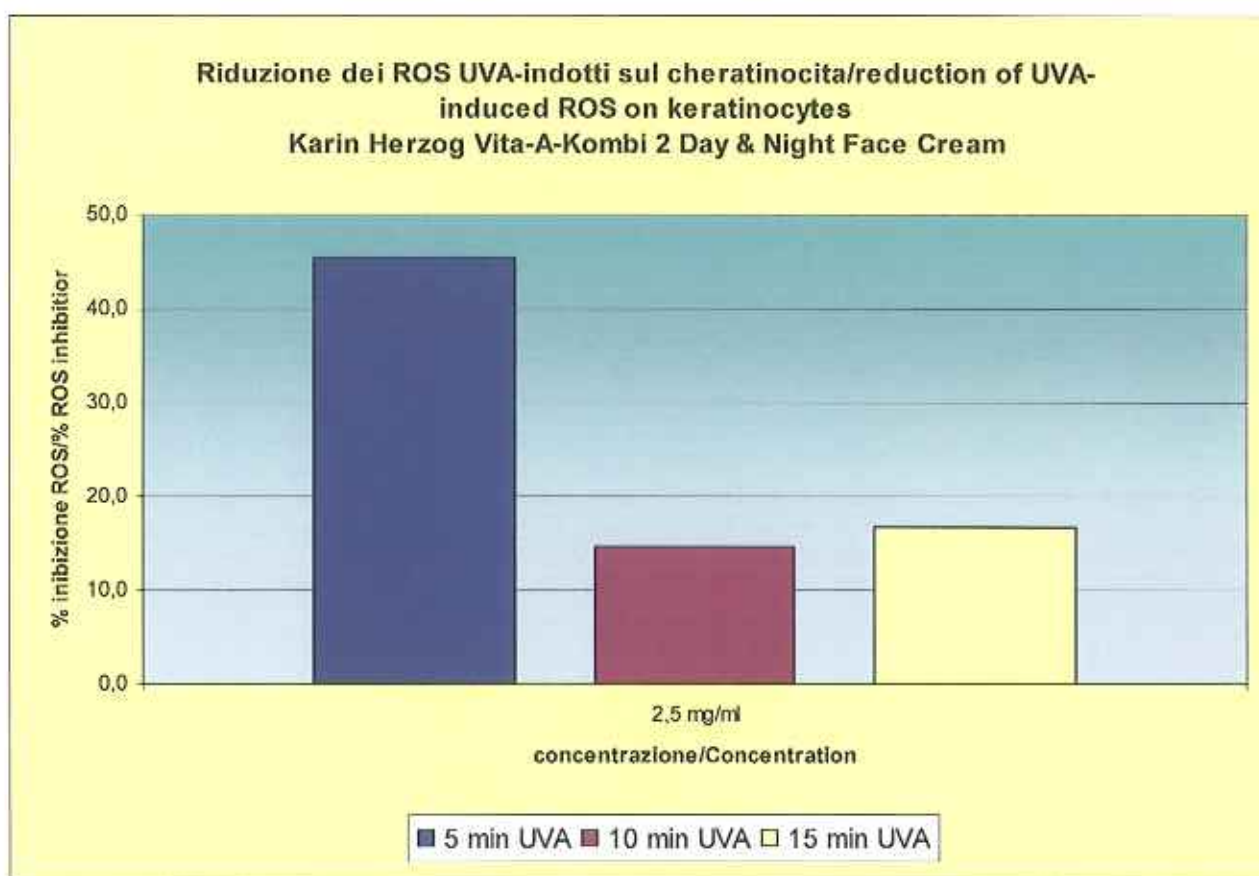
**Tabella 3.1.1.:** Riduzione % della produzione di ROS causata da UVA, dopo pretrattamento con il prodotto testato a diverse concentrazioni. (vedi fig. 3.1.1 and 3.1.2)/% reduction of UVA-induced ROS production after pre-treatment with the tested product at different concentrations (see fig 3.1.1. and 3.1.2).

	Esposizione Exposure	Karin Herzog Vita-A-Kombi 2 Day & Night Face Cream Codice interno/Inside code 324/06-05							vit C 0,15 mg/ml
		2,500	0,833	0,278	0,093	0,031	0,010	0,003	
% inibizione ROS/ROS Inhibition %	5'UVA	45,5	np	np	np	np	np	np	5,4
	10' UVA	14,6	np	np	np	np	np	np	21,3
	15' UVA	16,7	np	np	1,9	4,8	np	np	5,5

np: nessuna protezione/no protection



**Fig. 3.1.1 e Fig. 3.1.2:** Inibizione della produzione di ROS dopo pre-trattamento con il prodotto testato a diverse concentrazioni ed esposizione a 3 dosi di UVA. Valori espressi come percentuale di inibizione rispetto alla produzione di ROS che avviene nelle cellule non trattate ed esposte a UVA. /ROS production inhibition caused by pretreatment with the tested substances at different concentrations, after exposure to 3 different UVA dosages. Values expressed as % of ROS inhibition respect to untreated cells exposed to the same UVA dosages.



### 3.2 Valutazione della vitalità cellulare su cheratinociti umani con e senza esposizione UVA/ Cell viability evaluation on keratinocytes before and after UVA exposure.

Il prodotto testato non ha mostrato di indurre sia in presenza che in assenza di UVA significativi effetti citotossici alle concentrazioni indicate. Alla concentrazione più alta si riscontra una mortalità compresa tra il 21,6% (con stress UV) e il 16,2 % (senza stress).

The tested product did not show any ability to significantly reduce the cell viability, not even with and without UVA exposure at the named concentration. At the highest concentration we pointed out a slight cytotoxic effect ranging from 21,6% (with stress UV) and 16,2 % (without stress)

**Tab. 3.2.1** % della vitalità cellulare delle cellule trattate con la sostanza testata, rispetto alle cellule non trattate esposte e no all'UV. Cell vitality in % of the cells treated with the tested substance, respect to untreated cells, with and without UVA exposure.

	Esposizione Exposure	Karin Herzog Vita-A-Kombi 2 Day & Night Face Cream Codice interno/Inside code 324/06-05							vit C 0,15 mg/ml
		2,500	0,833	0,278	0,093	0,031	0,010	0,003	
% Vitalità cellulare cell viability %	15'UVA	78,4	95,7	105,3	103,4	106,9	105,4	104,2	94,5
	NO UVA	83,8	95,1	93,2	94,2	93,4	94,6	93,8	98,0





#### 4 Conclusioni/Conclusions

Il campione/The sample:

### **Karin Herzog Vita-A-Kombi 2 Day & Night Face Cream**

*POSSIEDE ATTIVITÀ DI INIBIZIONE DELLA PRODUZIONE DI ROS INDOTTI DA UVA NEL  
CHERATINOCITA SOLO ALLA CONCENTRAZIONE PIU' ALTA TESTATA (2,5 mg/ml)/*

*DOES SHOW INHIBITION ACTIVITY AGAINST UVA-INDUCED ROS RELEASE IN  
KERATINOCYTES ONLY AT THE HIGHEST TESTED CONCENTRATION (2,5 mg/ml)*

Verbania, 19/09/06

Il responsabile dello studio/The study supervisor

Dott. Elena Bocchietto





## Bibliografia/Bibliography

1. Alaluf S., Muir-Howie H., Hu H.L., Evans A. and Green M.R. (2000) Atmospheric oxygen accelerates the induction of a post-mitotic phenotype in human dermal fibroblasts: the key protective role of glutathione. *Differentiation* **66** (2-3):147-155
2. Amann S., Reinke C., Valet G., Moser U. and Leuenberger H. (1999). Flow-cytometric investigation of cellular metabolism during oxidative stress and the effect of tocopherol. *International Journal of Vitamines and Nutrition Research* **69** (5): 356-361
3. Cenni E., Ciapetti G., Granchi D., Arciola C.R., Savarino L., Stea S., Montanaro L. and Pizzoferrato A. (1999). Established cell lines and primary cultures in testing medical devices in vitro. *Toxicology In vitro* **13**: 801-810
4. Kanthasamy A.G., Ardelt B., Malave A., Mills E.M., Powley T.L., Borowitz J.L. and Isom G.E. (1997) Reactive Oxygen Species generated by cyanide mediate toxicity in rat pheochromocytoma cells. *Toxicology Letters*, **93**: 47-54.
5. LeBel C.P., Ali S.F., McKee M. and Bondy S.C. (1990) Organometal-induced increase in Oxygen Reactive Species: The potential of 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **104**: 17-24.
6. Diplock A.T., Charleux J.L., Crozier-Willi G., Kok, F.J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W., Vina-Ribes J., (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, **80**: S77-S112.
7. Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
8. Noel-Hudson M.S., Epaulé M.J., Bonnet m. and Wepierre j.(1994). Use of reconstructed epidermis in evaluation of toxicity and free scavenger activity of cosmetics. Poster: 18th International IFSCC Meeting IFSCC, Venezia.
9. Ritter D., Knebel J.W., Aufderheide M. and Mohr U. (1999) Development of a cell culture model system for routine testing of substances inducing oxidative stress. *Toxicology In vitro*, **13**: 745-751.
10. Sorg O., Tran C., Carraux P., Didierjean L. and Saurat J. (1999) Retinol and retinyl ester epidermal pools are not identically sensitive to UVA irradiation and anti-oxidant protective effect. *Dermatology* **199** (4): 302-307.
11. Thang P.T., Patrick S., Teik L.S. and Yung C.S. (2001) Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase induced damage. *Burns* **27**(4): 319-327.
12. Willis C.M., Britton L.E. Reiche L. Wilkinson J.D. (2001) Reduced levels of glutathione S-transferases in patch test reactions to dithranol and sodium lauryl sulphate as demonstrated by quantitative immunocytochemistry: evidence for oxidative stress in acute irritant contact dermatitis. *European Journal Dermatology* **11**(2): 99-104