



ABICH S.r.l.
Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

**IN VITRO АНАЛИЗ НА ПРОСЕНСИБИЛИЗИРАЩ
ПОТЕНЦИАЛ ВЪРХУ ЧОВЕШКИ ДЕНДРИТНИ КЛЕТКИ**

**IN VITRO ANALYSIS OF THE PRO-SENSITISING POTENTIAL
ON HUMAN DENDRITIC CELLS**

КЛИЕНТ /CUSTOMER	EUROVIX S.r.l. Viale Europa, 10 25046 Cazzago S. Martino (BS) - Italia
ПРОБА/SAMPLE	Micropan soluzione Lotto/Batch: n.p.
ДАТА НА ДОКЛАД/REPORT DATE	30/08/2011
ПРОТОКОЛ N./REPORT N.	REL/0892/2011/ALTOX/ELB

Pagina 1 di 15
REL/0892/2011/ALTOX/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



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

РЕЗЮМЕ/SUMMARY

1 ПЪРВА ЧАСТ/FIRST PART – DATI GENERALI/GENERAL FACTS.....	4
1.1 Клиент/CUSTOMER.....	4
1.2 Тествана проба/TEST SAMPLE.....	4
1.3 Дата на получаване на пробата/SAMPLE RECEIPT DATE.....	4
1.4 Извършени тестове/EXECUTED TESTS.....	4
1.5 Лаборатория/ENTRUSTED LABORATORY	4
1.6 Крайна дата на теста/TEST ENDING DATE	4
1.7 Експериментатор/EXPERIMENTER	4
1.8 Научен ръководител/SCIENTIFIC MONITOR.....	4
2 ВТОРА ЧАСТ /SECOND PART – ОПИСАНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО/STUDY DESCRIPTION	5
2.1 Цел/Aim	5
2.2 Наименование на пробите/SAMPLES DESCRIPTION	7
2.3 Подготовка на пробите/SAMPLE PREPARATION	7
2.4 Експериментален модел/CELL MODEL.....	7
2.5 Изпълнение на предварителен MTT тест/MTT PRELIMINAR ASSAY EXECUTION.....	8
2.6 Третиране и експозиция/TREATMENT AND EXPOSURE.....	9
2.7 Извършване на тест за чувствителност/SENSITISATION ASSAY EXECUTION	9
3 ТРЕТА ЧАСТ/THIRD PART - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS	10
3.1 Резултати/RESULTS	10
3.2 Заключение /CONCLUSIONS	13
4 БИБЛИОГРАФИЯ/VIBLIOGRAPHY	14



ABICH S.r.l.
Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

Описание/Preliminary

Докладът описва анализираната проба, целта на изследването, използваните методи и резултатите, получени по време на експерименталната работа.

В първата част се събират общите данни, във втората е описан експерименталният метод, а в третата са представени резултатите и заключенията.

Резултатите от теста се предоставят в графична форма, за да улеснят четенето. Тълкуването на резултатите е обобщено в последната част на работата.

Копие от този доклад се съхранява в ABICH S.r.l.

Всички резултати, свързани с извършените тестове, се съхраняват в научния институт San Raffaele.

This report contains the experimental data compiled during the *in vitro* safety evaluation 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(s), 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.

A copy of this report is kept on file at ABICH S.r.l.

The raw data that support the results and conclusions are kept at the San Raffaele Scientific Institute.

Бележки

Резултатите от тестовете, споменати в този доклад, се отнасят изключително до тествания продукт (и) и до специфичните експериментални условия, използвани в теста. Този доклад или части от него могат да бъдат възпроизведени само със съгласието на експерименталния отдел.

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 3 di 15
REL/0892/2011/ALTOX/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



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

1 ПЪРВА ЧАСТ/FIRST PART – Основни данни/General facts

1.1 Клиент/Customer

EUROVIX S.r.l.
Viale Europa, 10
25046 Cazzago S. Martino (BS) - Italia

1.2 Тествана проба/Test sample

Micropan soluzione; Партида/Batch: n.p., вътрешен код/internal code 1770/11-01

1.3 Дата на получаване на пробата/Sample receipt date

25/07/2011

1.4 Извършени тестове/Executed tests

- ◆ Предварителна оценка на жизнеспособността на клетките / цитотоксичността върху човешки дендритни клетки чрез МТТ метод.
- ◆ Оценка на стимулацията върху човешки дендритни клетки посредством FACS
- ◆ Preliminary evaluation of cytotoxicity on human dendritic cells through MTT assay.
- ◆ Evaluation of stimulating activity on human dendritic cells through FACS analysis.

1.5 Отговорна лаборатория /Entrusted laboratory

Научен институт на болница „Сан Рафаеле“, ул. Олгетина № 60 Милано, Лаборатория за молекулярна и клетъчна имунология Сан Рафаеле
Scientific Institute, via Olgettina 60, Milano –Italy, Cell and molecular Immunology Laboratory

1.6 Крайна дата на теста /Test ending date

05/08/2011

1.7 Експериментатор /Experimenter

Д-р Самуеле Бурастеро, хирург, специалист по алергии и клинична имунология / доктор по медицина, Allergology and Clinical Immunology Specialist, Изследовател в научния институт на болница Сан Рафаеле /Researcher at Scientific Institute San Raffaele Hospital

1.8 Научен ръководител /Scientific monitor

Д-р Елена Бокието, специалист-биолог по биотехнологии /Biotechnology specialist ABICH S.r.l. – Via 42 Martiri– 28924 -Verbania -Italy tel +39 (0)323 586239



ABICH S.r.l.
Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

2 ВТОРА ЧАСТ/SECOND PART - Описание на изследването /Study description

2.1 Цел/Aim

Целта на теста е да се оцени липсата на просенсибилизиращи ефекти от готови продукти или съставки за козметична, биомедицинска или локална употреба. При определянето на рамката за толерантност към кожата е важно да се вземе предвид, освен потенциала за дразнене, сенсibiliзиращият потенциал на продуктите и съставките за безопасна употреба.

При проведеното изпитване беше сметено за подходящо да се използва клетъчен модел за оценка на имунологичната реактивност на типични специализирани имунни клетки, които представят антигена (дендритни клетки), изложени на продължителен контакт (48h) с анализирания проба, в две различни концентрации. В кожата специализираните дендритни клетки, отговорни за първия контакт и представянето на антигена, са клетките на Лангерханс.

Трябва да се отбележи, че токсикологичните данни, предоставени от тестове на клетъчни модели, не могат да се считат за пълен заместител на тестовете *in vivo*, но със сигурност обширната научна литература, публикувана днес, им позволява да се считат за надеждни и полезни с информация за биологичните характеристики на тестваните вещества. Освен това, тъй като измененията на VI и VII на Директива 76/768 ЕО предвиждат отказ от използването на животни за тестване на готови продукти и козметични съставки и като се има предвид, че тестът за сенсibiliзация върху човешки доброволци е етично труден за прилагане, търсенето на *in vitro* прогнозни модели е задължително, което позволява да се направи възможно най-широка оценка на безопасността на употребата на готови продукти, както се изисква от законодателството (1-11). По същия начин, също и за медицински изделия стандартите UNI / EN 10993 предвиждат, когато е възможно, използването на алтернативни тестове за ограничаване на използването на животни (12).

Тестът е проведен върху незрели дендритни клетки, получени от моноцити от периферна кръв от здрав донор, тъй като този тип клетки играе централна роля в имунните отговори на кожата, типичен целеви орган на локални продукти. Човешките първични дендритни клетки са *in vitro* модел на Лангерханс, които представляват специфичния тъканен вариант на кожата. На тези клетки беше оценена модулацията на експресията на две костимулиращи молекули, CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2), като се използва като положителен контрол типично сенсibiliзиращо вещество за контакт, никелов сулфат и бактериални липополизахариди (LPS) като генерични стимулатори на имунния отговор. Никелът е способен да предизвиква алергични имунни реакции *in vivo* (сенсibiliзация при контакт) и е широко използван *in vitro* за изследване на модулацията на имунния отговор.

Разпознаването на антигена от TCR (Т клетъчен рецептор) на Т лимфоцити (сигнал 1) не е функционално за узряването на ефективен имунен отговор, ако не се случи на нивото на мембраната на клетка, представяща самия антиген и способна да осигуряват допълнителен сигнал (сигнал 2 или костимол), качествено основен за определянето на вида на отговора (хуморален, клетъчен и др.). Както B7.1, така и B7. 2 (заедно: B7) са мембранны гликопротеини, присъстващи на повърхността на множество антиген представящи клетки (дендритни клетки, клетки на Лангерханс, моноцити / макрофаги, различни клетъчни линии, включително кератиноцити) и действат като костимол. Възможно е и двете молекули са лиганди на гликопротеин, наречен CD28, присъстващ върху мембраната на Т-лимфоцита. Задействането на системата лиганд / рецептор CD28 / B7 предотвратява апоптозата (програмирана клетъчна смърт) на Т-клетките и си сътрудничи в подкрепа на тяхното разпространение и диференциация. В ранните етапи на "физиологичния" имунен отговор B7.2 е конститутивно изразен и модулира както Th1, така и Th2 отговорите. С напредването на имунния отговор B7.1 също се регулира нагоре и увеличава интензивността на костимулиращия сигнал, с разширяване на Т клетките и производство на различни цитокини. Освен това, B7.1 се

Pagina 5 di 15

REL/0892/2011/ALTOX/ELB



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

регулира за предпочитане по време на острата фаза на автоимунните отговори (13-25). Повишената експресия на тези костимулиращи молекули върху дендритни клетки следователно е знак за активиране на имунен отговор след излагане на потенциално алергичен антиген. Функционално, всъщност, експресията на костимулиращи молекули върху този тип клетки отговаря за придобиването на компетентност за представянето на антигена в типичното място (кожата и лигавиците в нашия случай), при което сензибилизацията на контакта се проявява *in vivo*.

The aim of the test is to evaluate that the tested product does not cause pro-sensitising effects on the involved cell model. For every product intended to come into direct and prolonged contact with the skin, it is important to consider, beside the irritating potential, even the sensitising potential in order to predict the general safety of the finished formula to avoid risks for the consumers.

In the test we used a cell model of dendritic cells to evaluate the immunological reactivity of typical immunity cells, specialised as antigen presenting cells, exposed for prolonged time (48h) to the tested product at different concentrations. In the skin, the dendritic cells specialized for the first contact as antigen presenting cells, are named *Langerhans Cells*.

It is necessary to premise that toxicological data from cell models cannot totally replace *in vivo* tests, but a wide scientific literature is available to support their reliability. Furthermore, the VIth and VIIth amendment at the EC Dir. 76/768 plans the abandon of animal testing for cosmetic products, and as sensitisation testing on human volunteers is ethically problematic, the development of alternative *in vitro* method to predict skin sensitisation is a forced route to evaluate the safety of employ of cosmetics (1-11). Furthermore, the use of *in vitro* tests, instead of *in vivo* models, is strongly recommended by the UNI/EN 10993 rules (12).

In the present study, we used monocytes-derived immature dendritic cells from human healthy blood volunteers, as prototypic blood-derived immunologically active cells. These cells play a central role in the skin immune response towards topical products. Human primary dendritic cells are an *in vitro* model of Langerhans cells. On these cells we checked out the expression of two co-stimulatory molecules, CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) using bacterial lipopolysaccharides (LPS, generic stimulators of immune response) and Nickel sulphate as two positive controls, Nickel being a well known contact sensitising agents, both in *in vitro* and *in vivo* models.

When the lymphocytes T' TCR recognize the antigen (signal 1) on the Antigen-Presenting Cell (APC), additional molecules (called co-stimulatory) on the APC's membrane are necessary to obtain a complete functional immune response (signal 2).

The signal 2 is very important to define the kind of immune response that is going to be activated (umoral, cellular, etc.)

The costimulatory molecules CD80 and CD86 (also called B7.1 and B7.2) are necessary to obtain an efficient antigen presentation by the T cell receptor (TCR) and hence to obtain a correct immune response. Both these molecules are membrane glycoprotein expressed on the surface of different antigen-presenting cells (dendritic cells, Langerhans cells, monocytes/macrophages, keratinocytes) and they recognise a further molecule, a glycoprotein called CD28 on the T lymphocyte membrane.

The switching on of the ligand/receptor system CD28/B7 avoids the T cell apoptosis and sustains their proliferation and differentiation and the production of many cytokines.



In the first phase of the physiological immune response, B7.2 is expressed as default and it modulates both the Th1 and Th2 responses. As the immune response goes on, also B7.1 is up-regulated and the costimulatory signal increase, with an expansion of T cells and the production of different cytokines. B7.1 is also preferentially up-regulated during the acute phase of auto-immune response (13-25).

The increasing level of expression of CD80 and CD86 on the dendritic cells is a signal of activation of the immune response derived from the exposition to a potentially sensitising contact antigen. Functionally, the expression of co-stimulatory molecules on the dendritic cells means activation of the immunological response in terms of capability to present the antigen in the typical tissues (skin and mucosae in our case), where, *in vivo*, the immune protective response is triggered.

2.2 Описание на пробите /Samples description

Наименование/Name	Описание /Description
Микропан soluzione Партида/Batch: п.р. Вътрешен код/Internal code: 1770/11-01	Прозрачна зелена течност / Green colour clear liquid
LPS	Бяла пудра /White powder
Никелов сулфат /Nickel sulfate	Кристали, разтворени в PBS, положителен сенсibiliзиращ контрол /Crystals dissolved in PBS, positive control as a sensitizer

2.3 Приготвяне на пробата /Sample preparation

Пробата се разтваря в етанол и след това се разрежда директно в средата за клетъчна култура при различни разреждания и се подлага на предварителен тест за цитотоксичност върху дендритни клетки, за да се оцени в каква концентрация пробата може да се използва *in vitro*, без да се причинява клетъчна смърт, събитие, което причинява промяна на резултатите. Средата за клетъчен растеж, оставена при същите експериментални условия, се счита за отрицателна контрола.

The sample was dissolved in ethanol and then diluted in the cell culture medium at different concentrations. The product underwent a preliminary cytotoxicity screening on the cells to decide the best concentration to test it without cytotoxic effects on the cells, in order to avoid false results. Cell medium exposed to the same experimental conditions were used as a negative control.

2.4 Експериментален модел/ Cell model

Използвана е първична човешка линия от дендритни клетки, получени от моноцити от периферна кръв от здрав донор. Клетките се култивират в RPMI 1640, с добавени FCS (10%) GM-CSF (50 ng / ml) и IL-4 (1000 IU / ml).

The test is carried out on a primary cell line of dendritic cells derived from human monocytes of healthy volunteers peripheral blood. Cells are kept in RPMI 1640, FCS (10%), GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (1000 IU/ml) added.



2.5 Провеждане на предварителния тест MTT/MTT preliminar assay execution

MTT тестът е прост, точен и осигурява възпроизводими резултати. Този метод първоначално е разработен от Mossman (27). Основният реагент е 3- [4,5-диметилтиазол-2-ил] -2,5-дифенил тетразолиев бромид или MTT, което дава жълт цвят във воден разтвор. Митохондриалната дехидрогеназа на жизнеспособни клетки прерязва тетразоловия пръстен, което води до образуването на лилаво-лилави кристали на формазан, неразтворими във вода. Кристалите се разтварят в подкислен изопропанол и полученият виолетов разтвор се измерва на спектрофотометъра. Увеличаването или намаляването на жизнеспособните клетки води до съпътстваща промяна в количеството образуван формазан и което може да се разглежда като показател за степента на цитотоксичност, причинена от излагане на тестваните вещества.

Средата за MTT се приготвя, както е описано (27). След третирането клетките се измиват с PBS и разтвор MTT и се добавя към всяка ямка, с последваща инкубация при 37 ° C. В края на инкубационния период средата-MTT се отстранява и солубилизиращият разтвор MTT се добавя към всяка ямка (27). Плочата се разклаща върху вибрационна машина за 20-30 минути, като се гарантира, че всички кристали са се разтворили и са образували хомогенен разтвор. Абсорбцията се отчита и фонът се изважда, както е описано в метода.

Резултатът се изразява като

$$\% \text{ оцеляване} = \frac{\text{OD третиранни клетки} \times 100}{\text{OD не третиранни клетки}}$$

The MTT assay is simple, accurate and yields reproducible results. This method has been developed originally by Mossman (27). 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 acidified 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. MTT-medium is prepared as described (27). After exposure of the cells to the test material, the cells are washed with PBS and exposed to the MTT-medium at 37°C.

At the end of the incubation period, the MTT-medium is removed and the cells receive the MTT solubilization solution. The plate is shaken on a rotatory plate shaker for 20-30 minutes, ensuring that all the crystals have dissolved from the cells and have formed a homogeneous solution. The absorbance is measured as described with background elimination. The results are expressed in terms of viability:

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{OD treated cultures} \times 100}{\text{OD untreated control cultures}}$$



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

2.6 Третиране и експозиция/Treatment and Exposure

След резултатите от предварителния тест, пробата се използва при две различни крайни разреждания върху дендритни клетки, като се разрежда в средата за клетъчна култура, за да се получат желаните крайни разреждания за контакт с клетките. Клетките бяха изложени за 48 h при 37 ° C с 5% CO₂.

Following the preliminary cytotoxicity investigation, the optimal testing concentrations were defined. The sample was diluted in the cell medium at the wished final concentrations and put in contact with the dendritic cells *in vitro*. The exposure has been carried out for 48 h at 37°C with 5% CO₂.

2.7 Провеждане на тест за чувствителност /Sensitisation assay execution

След излагане клетките бяха изследвани с оцветяване Трупан Blue и микроскопско наблюдение в камера за преброяване на клетките за жизнеспособност, събрани, промити в изотоничен буфер (PBS) и белязани с флуоресцеинирано анти тяло, насочено срещу B7.1 или B7. 2. След допълнително измиване за отстраняване на излишните антитела, клетките бяха поставени в поточен цитометър (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter, Becton Dickinson, Mountain View, CA) за оценка на MFI (средна интензивност на флуоресценция), пропорционална на брой белязани молекули на клетката и следователно представляващи нивото на експресия на изследваните от нас костимулаторни молекули.

Открити са морфологични качествени параметри (изменение на клетъчния обем, модификация на клетъчни грануляции), свързани с клетъчната некроза и апоптоза, събития, строго свързани с процеса на алергично предизвикване.

Като контрола (основна флуоресценция) MFI беше оценена както на дендритни клетки, които не са третирани по никакъв начин (с изключение на измиване в PBS), така и на дендритни клетки, реагирани с флуоресцеинирано моноклонално анти тяло (като тези срещу B7.1 и анти- B7.2), но с ирелевантна специфичност (съчетано с изотип контрол).

After the incubation with the tested substance and the controls, cells are collected, checked under the microscope for their vitality by staining with Trypan Blue dye and counting in a cell counter chamber, washed in PBS and then marked with a fluoresceinated anti-B7.1 or B7.2 antibody.

After washing, to eliminate the excess antibody, the MFI (Mean Fluorescence Intensity) linked to the cells was evaluated by means of a flux cytofluorimeter (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter, Becton Dickinson, Mountain View, CA).

This value is proportional to the expression of costimulatory molecules.

The MFI of the non-treated cells and of cells after reaction with a monoclonal isotype-matched antibody was used as an internal control (basal fluorescence).



3 ТРЕТА ЧАСТ/THIRD PART - Резултати и заключения /Results and conclusions

3.1 Резултати/ Results

Таблица 1 показва резултатите от дендритния анализ на първичната линия за експресия на костимулиращи молекули на поточния цитометър след 48 часа реакция с пробата при двете тествани концентрации и с контролите, коректни за отрицателната контрола.

In table 1 are reported the results expressed as co-stimulatory molecules expression after the exposition of the primary cell line for 48h to the investigated and control substances, subtracted of the negative controls (non treated cells basal values).

Таблица1/Table 1

Проби/Samples	CD80 (MFI*)	CD86 (MFI*)
Nickel Sulfate 20 µg/ml	24,42	40,58
Nickel Sulfate 10 µg/ml	15,96	30,34
Nickel Sulfate 4 µg/ml	5,13	5,68
LPS 1µg/ml	26,13	74,9
Micropan soluzione 2µl/ml	-0,56	-0,18
Micropan soluzione 0,4µl/ml	-0,28	-0,13

* MFI = средна интензивност на флуоресценцията - е средната геометрична стойност на интензивността на флуоресценцията на клетките, оцветени с флуоресцеинирано антитяло и е пропорционална на броя оцветени молекули на клетката.

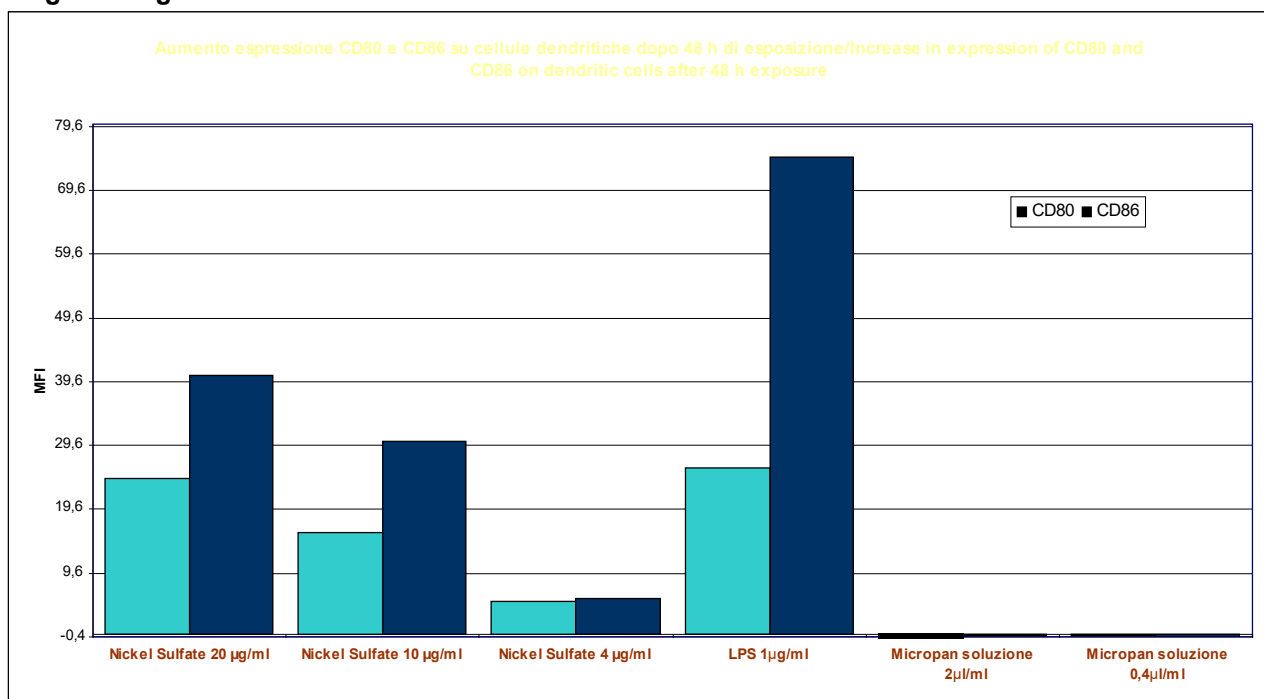
* MFI = Mean Fluorescence Intensity – it is the geometric average of the fluorescence intensity of the cells decorated with the fluoresceinated antibody and it is proportional to the number of stained molecules per cell.



Фигура 1 изобразява стойностите на експресията на CD80 и CD86, открити в анализиранията проба и съответните контроли, извадени от отрицателната контрола, т.е. стойността на пробата, обработена с флуоресцеинирано антителило с ирелевантна специфика.

In figure 1 are plotted the values of expression of CD80 and CD86 found for the tested sample and its relative controls, subtracted of the negative control (value of the sample treated with a fluoresceinated antibody of unrelevant specificity).

Figura 1/Figure 1



Наблюдавайки поведението на никела, типично алергенно вещество, може да се види, че се характеризира с:

- високо увеличение на двата маркера;
- пряка корелация на нарастването на интензивността на отговора с концентрацията;
- ефект, откриваем дори при много ниски дози. По подобен начин може да се наблюдава увеличение и на двата маркера с LPS.

Тестваната доза от 4 g / ml никелов сулфат ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) съответства на приблизително 1 ppm никел, стойност, която е около прага на алергенната доза при субекти, които вече са чувствителни и с раздразнена кожа (28, 29).

В експеримента беше потвърдено, че тази концентрация е в състояние да причини увеличение повече от два пъти на изследваните молекули в сравнение с нетретираните контроли (данните не са показани). Въпреки това концентрацията, способна да предизвика алергична реакция при най-чувствителните индивиди, е при много по-високи стойности, над 100 ppm никелов сулфат $6\text{H}_2\text{O}$, в контакт с непокътната и здрава кожа.



ABICH S.r.l.

Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

При тестваните концентрации, анализираната проба не показва никаква модулация на изследваните маркери.

Анализираната проба не показва цитотоксични ефекти върху клетките, използвани за анализа ($IC_{50} = 10 \mu\text{l} / \text{ml}$).

При използваните разреждания не са открити апоптотични ефекти върху изследваните клетки.

Showing the behaviour of Nickel, a prototypic sensitising substance, we can see how this is characterised by a) high increase of both the markers, with a predominance of CD80; b) direct correlation between concentration and intensity of the response; c) relevant effects even at very low doses. Also LPS increases the expression of both the investigated markers.

The tested dose of 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Nickel Sulphate ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) corresponds to more or less 1 ppm of Nickel, dosage that is around the minimal sensitising threshold in already sensitised individuals with irritated skin (28, 29). From above reported data, we can notice how a so low dose is already able to cause an increase from 2 times upwards of the investigated molecules (data not shown). The concentration that is able to cause an allergic reaction in most of the sensitive subjects is anyway around higher value, over the 100 ppm of Nickel Sulphate $6\text{H}_2\text{O}$ in contact with safe and intact skin .

The sample did not show any increase in the expression of both the investigated markers.

The sample did not show any cytotoxic effect on the cells used for the test ($IC_{50} = 10\mu\text{l}/\text{ml}$).

We did not observed any signal related to apoptosis on the treated cells.



ABICH S.r.l.
Analisi Biologiche e Chimiche
Tossicologia, Ricerche e Servizi



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

3.2 **Заклучения/Conclusions**

В горните експериментални условия пробата/ In the above experimental conditions, the sample:

Micropan soluzione

Партида/Batch:
n.p.

не увеличава in vitro експресията на нито един от изследваните маркери върху дендритни клетки, като по този начин показва, че няма сенсibiliзиращ потенциал за кожата и лигавиците.

doesn't affect in this in vitro model the investigated markers expression in immunocompetent cells and hence *it doesn't show any sensitizing potential for the skin and mucosae.*

Дата/Date: 30/08/2011

Ръководител на изследването
/ Study Monitor
Д-р Елена Бокието

Pagina 13 di 15
REL/0892/2011/ALTOX/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



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

4 Библиография/Bibliography

- 1) E. Bocchietto, C. Paolucci, D. Breda, E. Sabbioni and SE Burastero. Human monocytoid THP-1 cell line versus monocyte-derived human immature dendritic cells as in vitro models for predicting the sensitising potential of chemicals. *International Journal of immunopathology and pharmacology* Vol. 20 n°2, 261-268 (2007)
- 2) T. Ashikaga, Y Yoshida, H. Hirota et al, Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the Human Cell Line Activation Test (h-CLAT): I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicology in vitro* 20 (2006) 767-773.
- 3) H. Sakaguchi, T. Ashikaga, M. Miyazawa et al., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicology in vitro*, Vol 20 Issue 5 August 2006 Pages 776-784.
- 4) Masato Mizuashi, Tomoyuki Ohtani, Satoshi Nakagawa et al, Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 124:579-586, 2005.
- 5) Bocchietto E, Paolucci C, Breda D, Pecis L , Burastero S. In vitro prediction of contact sensitization: simultaneous evaluation of dendritic cells and of T lymphocytes in a coculture system. *Atti del Congresso internazionale della Contact Dermatitis Society, Roma, 11-16 giugno 2002.*
- 6) Bocchietto E, Pecis L, Callegari E, Picardo M. Indagine in vitro del potenziale sensibilizzante di prodotti cosmetici nella prevenzione della dermatite atopica e da contatto. *Atti del 2° Congresso nazionale della Società Italiana di Dermatologia Allergologica, Professionale e Ambientale, Milano, 25-26 Ottobre 2001.*
- 7) De Silva O et al. Alternative methods for skin sensitisation testing. *ATLA*, 1996; 24:683-705.
- 8) Fubini B et al. Non-animal tests for evaluating the toxicity of solid xenobiotics. *ATLA*, 1998; 26: 579-617.
- 9) Balls M et al. The three Rs: the way forward. *ATLA*, 1995; 23:838-866.
- 10) Michael Balls, Enrico Sabbioni. Promotion of research on in vitro immunotoxicology. *The Science of Total Environment*, 270 (2001) 21-25.
- 11) Alternative (Non animal) Methods for chemical testing: current status and future prospects. Edited by Andrew Worth and Michael Balls, *ATLA* 30, Supplement 1, Chapter 6, pgg 49-53, 2002 European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Institute for Health and Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, Ispra (VA), Italy
- 12) Norma UNI/EN ISO 10993-1.
- 13) Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell* 1995;81:979-82.
- 14) Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707-18.
- 15) Lenschow DJ, Walunas TL , Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell stimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14:233-58.
- 16) Pechhold K, Patterson NB, Craighead N, Lee KP, June CH, Harlan DM. Inflammatory cytokines IFN-gamma plus TNF-alpha induce regulated expression of CD80 (B7-1) but not CD86 (B7-2) on murine fibroblasts. *J Immunol* 1997;158:4921-9.
- 17) Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE, Leung DY. Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:96-102.
- 18) Larche M, Till SJ, Haselden BM, North J, Barkans J, Corrigan CJ, Kay AB, Robinson DS. Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. *J Immunol* 1998;161:6375-82.

Pagina 14 di 15
REL/0892/2011/ALTOX/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



San Raffaele
Biomedical Science Park
www.alltox.it

- 19) Burastero SE, Magnani Z, Confetti C, Balbo P, Oddera S, Rossi GA. CD80 Molecule expression by alveolar macrophages (AM) is enhanced in allergic asthma and it is involved in allergen presentation to allergen-specific T-cells. *Eur Respir J* 1998;12 (suppl. 28):159s.
- 20) Van Neerven RJ, Van de Pol MM, Van der Zee JS, Stiekema FE, De Boer M, Kapsenberg ML. Requirement of CD28-CD86 costimulation for allergen-specific T cell proliferation and cytokine expression. *Clin Exp Allergy* 1998;28:808-16.
- 21) Schweitzer AN, Sharpe AH. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J Immunol* 1998;161:2762-71.
- 22) Burastero SE, Magnani Z, Confetti C, Balbo P, Oddera S, Rossi GA. CD80 expression on alveolar macrophages and presence of airway eosinophils in asthma and in rhinitis before and after allergen challenge. *Eur Respir J* 1998;12 (suppl. 28):112s.
- 23) Larch M, Till SJ, Haselden BM, North J, Barkans J, Corrigan CJ, Kay AB, Robinson DS. Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. *J Immunol* 1998;161:6375-82.
- 24) Burastero SE, Magnani Z, Confetti C, Abbruzzese L, Oddera S, Balbo P, Rossi GA, Crimi E. Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1136-42.
- 25) Jaffar ZH, Stanciu L, Pandit A, Lordan J, Holgate ST, Roberts K. Essential Role for Both CD80 and CD86 Costimulation, But Not CD40 Interactions, in Allergen-Induced Th2 Cytokine Production from Asthmatic Bronchial Tissue: Role for alpha beta, But Not gamma delta, T Cells. *J Immunol* 1999;163:6283-6291.
- 26) Burastero S, Magnani Z, Confetti C, Abbruzzese L, Oddera S, Balbo P, Rossi G, Crimi E. Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes. *J All Clinical Immunol* 1999;103:1136-1142.
- 27) Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1993, 65:55-63.
- 28) Gawkrödger DJ, Nickel dermatitis: how much Nickel is safe? *Contact Dermatitis* 1996; 35: 267-271.
- 29) Tanojo H, Hostynek JJ, Mountford HS, Maibach HI. In vitro permeation of nickel salts through human stratum corneum. *Acta Derm Venereol Suppl*, 2001; 212: 19-23.
- 30) E. Bocchietto, C. Paolucci, D. Breda, E. Sabbioni and SE Burastero. Human monocytoïd THP-1 cell line versus monocyte-derived human immature dendritic cells as in vitro models for predicting the sensitising potential of chemicals. *International Journal of immunopathology and pharmacology* Vol. 20 n°2, 261-268 (2007)
- 31) T. Ashikaga, Y Yoshida, H. Hirota et al, Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the Human Cell Line Activation Test (h-CLAT): I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicology in vitro* 20 (2006) 767-773.
- 32) H. Sakaguchi, T. Ashikaga, M. Miyazawa et al., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicology in vitro*, Vol 20 Issue 5 August 2006 Pages 776-784.
- 33) Masato Mizuashi, Tomoyuki Ohtani, Satoshi Nakagawa et al, Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 124:579-586, 2005.

Pagina 15 di 15
REL/0892/2011/ALTOX/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.