

## **Valutazione *in vitro* dell'attività lenitiva di un prodotto cosmetico**

---

### ***In vitro evaluation of soothing activity of a cosmetic product***

**Materia Medica Processing S.r.l.**

**Estratto canapa sativa 50% cbd**

Protocollo n° / *Report no.* **1901A31V**

<b>Comitato Tecnico Scientifico</b> <b><i>Scientific Technical Committee</i></b> <b>Bio Basic Europe S.r.l.</b> Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Eliana REGOLA, Riccardo VICINI, Alice BUZZELLA	<b>INDICE</b> <b>INDEX</b>
<b>Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità</b> <b><i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i></b> 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.	Riassunto <b><i>Abstract</i></b> pag. 3
<b>Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab</b> <b><i>Project Responsible Bio Basic Lab</i></b> Dr.ssa Eliana 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)	Introduzione <b><i>Introduction</i></b> pag. 4
<b>Responsabile Laboratorio Test <i>in vitro</i> Bio Basic Europe e Responsabile della Relazione</b> <b><i>In vitro Tests Responsible Bio Basic Europe and Person responsible for the report</i></b> 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)	Scopo <b><i>Aim</i></b> pag. 6
<b>Sperimentatore Bio Basic Lab</b> <b><i>Bio Basic Lab Experimenter</i></b> Dr.ssa Alice BUZZELLA Laurea in Biologia Sperimentale ed Applicata (Università degli Studi di Pavia)	Materiali e metodi <b><i>Materials and methods</i></b> pag. 7
	Risultati <b><i>Results</i></b> pag. 10
	Conclusioni <b><i>Conclusions</i></b> pag. 13
	Bibliografia <b><i>References</i></b> pag. 14

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

L'attività lenitiva del prodotto testato è stata valutata misurando la sua capacità di prevenire la formazione di citochine in colture cellulari di cheratinociti umani. In particolare è stata valutata la sintesi di **interleuchina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )**. E' stato eseguito un saggio preliminare di vitalità cellulare allo scopo di individuare le concentrazioni del prodotto su cui condurre il dosaggio delle citochine. I cheratinociti sono stati trattati con concentrazioni scalari del prodotto testato (diluizioni 1:2 a partire da 1.0 mg/ml) ed è emerso che la vitalità cellulare diminuisce significativamente alle concentrazioni testate comprese tra 0.25 e 1.0 mg/ml, pertanto per eseguire il dosaggio delle citochine sono state scelte le concentrazioni di 0.1, 0.05 e 0.02 mg/ml.

Per il dosaggio delle citochine, le cellule sono state trattate con il campione in esame alle concentrazioni stabilite. Cellule non trattate rappresentano il controllo negativo. Come controllo positivo è stata utilizzata una sostanza con nota attività anti-infiammatoria (PC). La produzione di citochine è stata indotta utilizzando lipopolisaccaride (LPS). Al termine del saggio è stato eseguito un secondo test MTT per verificare la vitalità cellulare.

Dai risultati ottenuti è emerso che il prodotto testato è in grado di ridurre significativamente la produzione di citochine alle concentrazioni di 0.1, 0.05 e 0.02 mg/ml.

## ABSTRACT

*The soothing activity of the tested product has been assessed by measuring its ability to prevent the formation of cytokines in cell cultures of human keratinocytes. In particular we evaluated the synthesis of **interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )**. We performed a preliminary cell viability assay in order to identify the concentrations of the product to use in the cytokines dosage. The keratinocytes were treated with scalar concentrations of tested product (dilutions 1:2 to from 1.0 mg/ml). We observed that cell viability decreases significantly at tested concentrations between 0.25 and 0.1 mg/ml, therefore to perform the dosage of cytokines we chose the concentrations of 0.1, 0.05 and 0.02 mg/ml.*

*For the determination of cytokines, the cells were treated with the tested sample at the chosen concentrations. Untreated cells represent the negative control. As positive control we used a substance with well known anti-inflammatory activity (PC). The production of cytokines was induced using lipopolysaccharide (LPS). At the end of the assay we performed a second MTT test to check cell viability.*

*The results have shown the ability of the tested product to significantly reduce the synthesis of cytokines at tested concentrations of 0.1, 0.05 and 0.02 mg/ml.*

## INTRODUZIONE

La pelle è l'organo più esteso del corpo umano, con una struttura unica che la rendono una barriera contro le infezioni ed altri eventuali rischi/pericoli ambientali. Sebbene l'infiammazione sia considerata una manifestazione di una condizione alterata della pelle, possono tuttavia essere presenti bassi livelli di infiammazione, o ciò che viene considerato l'inizio di un processo infiammatorio, anche in assenza di evidenze cliniche. L'irritazione cutanea rappresenta una reazione non immunologica di tipo infiammatorio, locale e reversibile, caratterizzata da eritema ed edema.

Numerosi prodotti cosmetici vengono impiegati per le loro proprietà lenitive allo scopo di ridurre l'irritazione cutanea indotta da diversi fattori esterni a cui la cute è esposta (ad esempio inquinanti ambientali, sole, clima freddo o secco), ma anche da alcune azioni quotidiane necessarie come la rasatura o l'uso di detergenti per l'igiene personale. Questi ultimi prodotti vengono usati per rimuovere lo sporco, il sudore, il sebo, oli, batteri e inquinanti ambientali dalla pelle. Sebbene la maggior parte dei detergenti e dei saponi siano in grado di rimuovere queste impurità, i prodotti più aggressivi possono danneggiare le proteine ed i lipidi della pelle provocando una sensazione di secchezza, irritazione e prurito. Pertanto la necessità dell'igiene personale non deve andare a discapito dell'integrità della barriera cutanea. Uno degli obiettivi principali dei formulatori che si occupano di prodotti per la cura della persona è quindi quello di creare detergenti, creme e altri prodotti di applicazione topica il più delicati possibile. Un modo per stabilire l'azione lenitiva di un prodotto cosmetico o la sua delicatezza globale è quello di misurare i markers infiammatori indicativi dell'irritazione cutanea.

Diverse sostanze irritanti possono dare inizio ai processi infiammatori. Il principale meccanismo utilizzato dalle cellule epidermiche per partecipare alle reazioni infiammatorie della pelle è la produzione e la risposta alle citochine. Nell'epidermide i cheratinociti sono la principale fonte di citochine insieme alle cellule di Langerhans, ai mastociti cutanei, alle cellule dendritiche e ai macrofagi. Mentre i cheratinociti a riposo producono alcune citochine costitutivamente, numerosi stimoli ambientali, tra cui radiazioni ultraviolette e agenti chimici, possono stimolarli a rilasciare citochine infiammatorie (IL-1, TNF- $\alpha$ ), citochine chemotattiche (come la IL-8) e citochine che promuovono la proliferazione cellulare (come la IL-6 e la IL-7).

La **interleuchina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )** viene prodotta costitutivamente in grandi quantità dai cheratinociti: in condizioni normali rimane immagazzinata al loro interno, mentre un danno o stimoli di diversa natura possono determinarne il rilascio. La IL-1 $\alpha$  è già attiva nella sua forma di precursore, quindi a differenza delle altre citochine infiammatorie non ha bisogno di un taglio proteolitico per venire attivata. Il ruolo principale della IL-1 $\alpha$  è di mantenere integre le funzioni di barriera della pelle prevenendo l'ingresso di microrganismi patogeni nel corpo: un danno ai cheratinociti porta al rilascio di IL-1 $\alpha$  e di conseguenza al rilascio e alla produzione di altre citochine, come la IL-8 e la IL-6. La IL-1 $\alpha$  induce inoltre la produzione di diversi mediatori dell'infiammazione, tra cui la cicloossigenasi (COX-2), la fosfolipasi A2 e la ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS). La IL-1 $\alpha$  è impiegata come marker per confrontare la delicatezza di formulazioni topiche e per stabilire il potenziale di irritazione cutanea: i detergenti delicati non determinano un aumento del rilascio di IL-1 $\alpha$  dai cheratinociti, garantendo così il mantenimento dell'integrità della barriera cutanea.



## INTRODUCTION

*Skin is the body's largest organ with a unique architecture which enables it to serve as a barrier against infection and other environmental hazards. Inflammation is considered a manifestation of an abnormal skin condition. However, low levels of inflammation or what is considered to be the onset of inflammation can occur in the absence of clinical manifestations such as erythema (skin redness).*

*Several cosmetic products are used as "lenitive" in order to reduce the condition of skin irritation - a non-immunological local reversible inflammatory reaction, characterized by erythema and edema – induced by several external factors to which the skin is exposed (ex. environmental pollutants, sun, cold or dry weather), but also by some daily and necessary actions like shaving or bathing. Cleansers used during bathing are designed to remove dirt, sweat, sebum, oils, bacteria and environmental pollutants from the skin. Although most cleansers and soaps will remove these impurities, harsh cleansers can cause damage to skin proteins and lipids, leading to after-wash tightness, dryness, barrier damage, irritation and pruritus. Given these considerations, the benefit of personal hygiene should be balanced with maintenance of skin barrier integrity. One of the primary goals of formulators who create personal care products should be to create cleansers, emollients and other topicals that are as mild as possible. One way to assess the lenitive action of a cosmetic product or its overall mildness is to measure inflammatory markers that are indicative of skin irritation.*

*Different skin irritants can trigger different inflammatory processes. The major mechanisms used by epidermal cells to participate in immune and inflammatory skin reactions are the production of cytokines and responses to cytokines. Within the epidermis, keratinocytes are the major source of cytokines, along with Langerhans cells, dermal mast cells, dendritic cells and macrophages. While resting keratinocytes produce some cytokines constitutively, a variety of environmental stimuli, such as tumor promoters, ultraviolet light and chemical agents, can induce epidermal keratinocytes to release inflammatory cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$ ), chemotactic cytokines (like IL-8) and growth promoting cytokines (like IL-6 and IL-7).*

***Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )** is constitutively produced in large amounts by keratinocytes: in normal conditions it remains stored inside them, while a damage or stimuli of various kinds can determine its release. The IL-1 $\alpha$  is active in its precursor form, so unlike other inflammatory cytokines, it does not need to undergo proteolytic cleavage to become active. The primary role of IL-1 $\alpha$  is to maintain skin barrier function by preventing the entry of pathogenic microorganisms into the body: a damage to keratinocytes releases IL-1 $\alpha$ , which stimulates further release of IL-1 $\alpha$  and the production and release of other cytokines such as IL-8 and IL-6. IL-1 $\alpha$  also induces the production of several inflammatory mediators, including cyclooxygenase (COX)-2, type 2 phospholipase A and inducible nitric oxide synthase (iNOS). IL-1 $\alpha$  is used as a marker to compare the mildness of topical formulations and to assess dermal irritation potential: mild cleansers do not upregulate or exacerbate the release of IL-1 $\alpha$  from keratinocytes, thus preserving skin barrier integrity.*



## SCOPO

Lo scopo del test è quello di valutare se il prodotto testato, a differenti concentrazioni, sia in grado di ridurre la produzione di citochine *in vitro*. Per questo motivo è stata testata la sua efficacia nel ridurre la sintesi di **interleuchina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )**. Si ritiene che tale capacità renda il prodotto un potenziale candidato lenitivo *in vivo*, in grado di ridurre il processo di irritazione ed arrossamento cutaneo.

## AIM

*The aim of the test is to assess whether the tested product, at different concentrations, is able to reduce the production of cytokines in vitro. To this purpose we tested its ability in reducing the synthesis of **interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )**. It is believed that this ability makes the product a potential soothing candidate in vivo, able to counteract the process of skin irritation and redness.*



## **MATERIALI E METODI**

### ***MATERIALS AND METHODS***

#### **Colture cellulari**

Il monostrato di cheratinociti è altamente rappresentativo del tessuto target in vivo. Le cellule Huker sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplementato con siero fetale bovino (10%) e glucosio (4.5 g/l) ed incubate in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

#### ***Cell line and culture conditions***

*Keratinocytes cells monolayers is highly representative of the target tissue in vivo. Huker cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with fetal bovine serum (10%) and glucose (4.5 g/l) and incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Good cell culture practices were used.*

#### **Campione testato / *Tested sample***

**Estratto canapa sativa 50% cbd**



## **Valutazione della vitalità cellulare**

Prima del dosaggio delle citochine è stato condotto un saggio di vitalità cellulare, allo scopo di scegliere le concentrazioni su cui eseguire il dosaggio successivo. Al termine del saggio il test di vitalità è stato ripetuto per stabilire se i trattamenti condotti abbiano avuto un effetto negativo sulle cellule. La vitalità cellulare è stata valutata mediante test MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], un composto tetrazolico di colore giallo che viene ridotto dalle cellule in formazano di colore viola. Questa conversione è causata dal NADPH o dal NADH prodotto dalle deidrogenasi presenti nelle cellule metabolicamente attive. Le cellule sono state 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.

## **Dosaggio delle citochine**

Il test è stato condotto in parallelo su due serie di cellule: una non trattata e l'altra trattata con lipopolisaccaride (LPS) per stimolare la produzione di interleuchine. Le cellule sono state trattate con le concentrazioni prestabilite del prodotto da testare e del controllo positivo (CQ). Cellule non trattate con il campione rappresentano il controllo negativo. Il contenuto di interleuchine nel terreno di coltura è stato determinato mediante test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), una tecnica biochimica molto diffusa ed impiegata per la quantificazione di proteine e peptidi. In un saggio ELISA un antigene specifico per la interleuchina da identificare viene immobilizzato su una superficie solida (il fondo di un pozzetto) a cui viene aggiunto il mezzo per il dosaggio. La rilevazione viene fatta mediante un anticorpo secondario biotinilato e fatto quindi reagire con streptavidina-HRP. La reazione colorimetrica risulta proporzionale alla quantità di citochina presente. I risultati si leggono tramite spettrofotometro a 450 nm. I valori ottenuti sono stati quindi interpolati in una curva standard di interleuchina.





## ***Evaluation of cell viability***

*A cell viability assay was performed prior the cytokines dosage in order to choose the concentrations to use for the analysis of cytokines. The viability assay was repeated in order to asses the potential negative effect of the performed treatments on the cells. The cell viability was evaluated through a MTT test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], a yellow compound that is bio-reduced by cells into a purple colored formazan product. This conversion is accomplished by NADPH or NADH produced by dehydrogenase enzymes in metabolically active cells. 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.*

## ***Dosage of cytokines***

*The test was performed in parallel on two sets of cells: one untreated and the other treated with lipopolysaccharide (LPS) to stimulate the production of interleukins. The cells were treated with the chosen concentrations of the tested product and the positive control (CQ). Cells not treated with the sample are the negative controls. The content of interleukins in the culture medium was determined by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), a plate-based assay technique designed for detecting and quantifying substances such as peptides, proteins, antibodies and hormones.*

*In an ELISA assay a specific antigen for the interleukin to identify is immobilized on a solid surface (the bottom of a well) to which is added the culture medium for the dosage. The detection is made by mean of a secondary biotinylated antibody which then reacts with streptavidin-HRP. The colorimetric reaction is proportional to the amount of cytokine present in the medium. The results are read using a spectrophotometer at 450 nm. The values obtained were then interpolated in a standard curve of interleukin.*

## RISULTATI

### RESULTS

#### Valutazione della vitalità cellulare

##### *Cell viability evaluation*

	CAMPIONE / SAMPLE (mg/ml)						
	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1,0
Vitalità cellulare (%) <i>Cell viability (%)</i>	92,07	96,86	99,00	92,14	56,00	45,29	13,50

La densità ottica (OD) misurata a 540 nm è proporzionale alla vitalità cellulare. Le percentuali sono state calcolate in base ai valori di assorbanza a 540 nm e considerando come 100% l'assorbanza del controllo negativo (cellule non trattate)

*The optical density (OD) measured at 540 nm is proportional to cell viability. Percentages were calculated based on the absorbance values at 540 nm and taking as 100% the absorbance of the negative control (untreated cells)*

**In base ai risultati ottenuti si sono scelte le concentrazioni pari a 0.1, 0.05 e 0.02 mg/ml per effettuare il dosaggio delle interleuchine**

***Based on obtained results, we chose the concentrations of 0.1, 0.05 and 0.02 mg/ml to perform the interleukins assay***

## Controllo della vitalità al termine del saggio *Control of cell viability at the end of the assay*

	LPS (+)			
	Controllo <i>Control</i>	Campione / <i>Sample</i> (mg/ml)		
		0,10	0,05	0,02
Valore medio OD <i>OD Mean value</i>	1,960	1,746	1,994	1,998
% inibizione della vitalità cellulare <i>% of inhibition of cells viability</i>	0,0	10,903	0,000	0,000

L'assorbanza misurata a 540 nm è proporzionale alla vitalità cellulare. Le percentuali sono state calcolate in base ai valori di assorbanza a 540 nm e considerando come 100% l'assorbanza del controllo negativo (cellule non trattate)

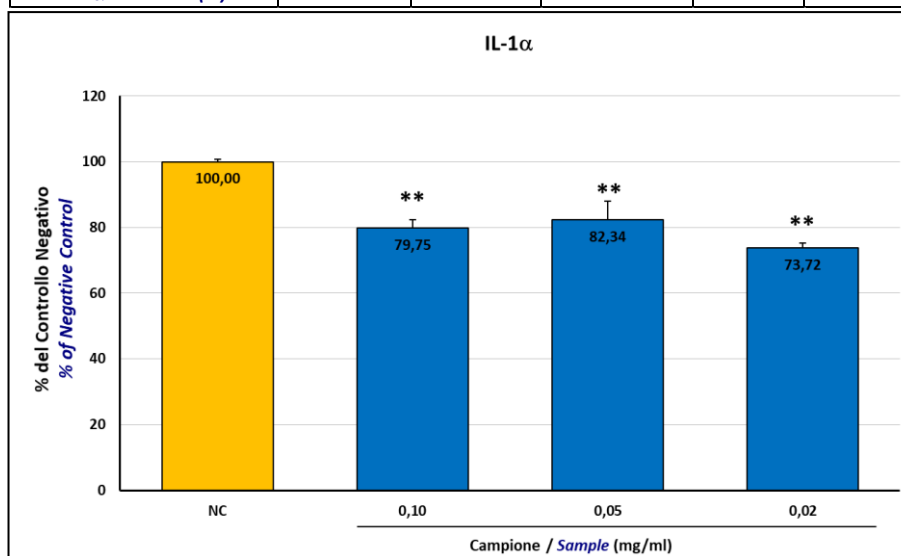
*The absorbance measured at 540 nm is proportional to cell viability. Percentages were calculated based on the absorbance values at 540 nm and taking as 100% the absorbance of the negative control (untreated cells)*

**Il trattamento con LPS e con il campione testato non determinano  
variazioni significative della vitalità cellulare**

***The treatment with LPS and with tested sample  
doesn't significantly affect cell viability***

## Dosaggio delle interleuchine *Dosage of interleukines*

	Controllo <i>Control</i>	CAMPIONE / SAMPLE (mg/ml)			PC
		0,10	0,05	0,02	
Valore medio OD <i>OD Mean value</i>	0,082	0,066	0,068	0,061	0,063
Valore medio IL-1 $\alpha$ (pg/ml) <i>IL-1 <math>\alpha</math> mean value (pg/ml)</i>	45,51	36,29	37,47	33,55	34,33
IL-1 $\alpha$ (% di NC) <i>IL-1 <math>\alpha</math> (% of NC)</i>	100,00	79,75	82,34	73,72	75,44
Riduzione IL-1 $\alpha$ (%) <i>IL-1 <math>\alpha</math> reduction (%)</i>	0,0	20,2	17,7	26,3	24,6



L'assorbanza misurata a 450 nm è direttamente proporzionale alla quantità di interleuchina prodotta dalle cellule. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard. L'elaborazione statistica dei dati è stata eseguita mediante test del t di Student. Sono considerati significativi valori di  $p < 0.05$ . NC = cellule di controllo non trattate; PC = controllo positivo (cellule trattate con sostanza a nota azione anti-infiammatoria). \*  $p < 0.05$  vs NC; \*\*  $p < 0.01$  vs NC

*The absorbance measured at 450 nm is directly proportional to the quantity of interleukin produced by the cells. The values are expressed as means  $\pm$  standard deviation. Statistical data processing was performed by Student's t-test. We considered significant values of  $p < 0.05$ . NC = untreated control cells; PC = positive control (cells treated with a well known anti-inflammatory drug). \*  $p < 0.05$  vs NC; \*\*  $p < 0.01$  vs NC*

***Il prodotto testato risulta in grado di ridurre significativamente la produzione di IL-1 $\alpha$  alle concentrazioni testate di 0.1, 0.05 e 0.02 mg/ml (riduzione rispettivamente del 20.2%, 17.7% e 26.3%)***

***The tested product has proved to significantly reduce IL-1 $\alpha$  at tested concentrations of 0.1, 0.05 and 0.02 mg/ml (reduction of 20.2%, 17.7% and 26.3%, respectively)***



## CONCLUSIONI

Il campione denominato  
**Estratto canapa sativa 50% cbd**

**è in grado di ridurre la sintesi di interleuchine *in vitro***

Il prodotto testato riduce significativamente la quantità di interleuchine prodotte da cheratinociti *in vitro* alle concentrazioni testate di 0.1, 0.05 e 0.02 mg/ml

## CONCLUSIONS

*The sample called*  
***Estratto canapa sativa 50% cbd***

***is able to reduce the synthesis of interleukins in vitro***

*The tested product significantly reduces the interleukins production in cell cultures of human keratinocytes in vitro at tested concentrations of 0.1, 0.05 and 0.02 mg/ml*



## **BIBLIOGRAFIA / REFERENCES**

- Ananthapadmanabhan KP, Moore DJ, Subramanyan K, Misra M, Meyer F. Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing. *Dermatol Ther* 2004; 17 Suppl 1: 16-25
- Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 101S-7S
- Barker JN, Jones ML, Mitra RS, Crockett-Torabe E, Fantone JC, Kunkel SL, Warren JS, Dixit VM, Nickoloff BJ. Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *Am J Pathol* 1991; 139: 869-76
- Corsini E, Galli CL. Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett* 1998; 102-103: 277-282
- Dickel H, Gambichler T, Kamphowe J, Altmeyer P, Skrygan M. Standardized tape stripping prior to patch testing induces upregulation of Hsp90, Hsp70, IL-33, TNF- $\alpha$  and IL-8/CXCL8 mRNA: new insights into the involvement of 'alarmins'. *Contact Dermatitis* 2010; 63: 215-22
- Didierjean L, Salomon D, Merot Y, Siegenthaler G, Shaw A, Dayer JM, Saurat JH. Localization and characterization of the interleukin 1 immunoreactive pool (IL- 1 alpha and beta forms) in normal human epidermis. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 809-16
- Gelmetti C. Skin cleansing in children. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15 Suppl 1: 12-5
- Jung Y-J, Jung M, Kim M, Hong S-P, Choi EH. IL-1 $\alpha$  stimulation restores epidermal permeability and antimicrobial barriers compromised by topical tacrolimus. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 698-705
- Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 2008; 132: 818-31
- Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74: 1-10.
- Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima K. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 1989; 68: 31-6
- McKenzie RC, Sauder DN. The role of keratinocytes cytokines in inflammation and immunity. *J Invest Dermatol* 1990; 95, 1055-1075
- Mohamadzadeh M, Müller M, Hultsch T, Enk A, Saloga J, Knop J. Enhanced expression of IL-8 in normal human keratinocytes and human keratinocyte cell line HaCaT in vitro after stimulation with contact sensitizers, tolerogens and irritants. *Exp Dermatol* 1994; 3: 298-303
- Oyoshi MK, He R, Kumar L, Yoon J, Geha RS. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis. *Adv Immunol* 2009; 102: 135-226
- Subramanyan K. Role of mild cleansing in the management of patient skin. *Dermatol Ther* 2004; 17 Suppl 1: 26-34
- William IR, Kupper TS. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* 1996; 58: 1485-1507
- Wilmer JL, Luster MI. Chemical induction of interleukin-8, a proinflammatory chemokine, in human epidermal keratinocyte cultures and its relation to cytogenetic toxicity. *Cell Biol Toxicol* 1995; 11: 37-50