



Valutazione *in vitro* dell'attività rigenerante di un prodotto cosmetico

In vitro evaluation of the regenerating activity of a cosmetic product

MATERIA MEDICA PROCESSING S.R.L.

Estratto canapa sativa 50% cbd

Protocollo n°/*Record no.* **1903A31V**

Luogo e data di emissione MILANO – 8 Marzo 2019
Place and date of issue *MILAN – 8th March 2019*

<p>Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Eliana REGOLA, Riccardo VICINI, Alice BUZZELLA</p> <p>Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità <i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i> Dr. Claudio ANGELINETTA Laurea in Chimica (Università degli Studi di Milano); Specializzato in Scienza e Tecnologia Cosmetiche (Università degli Studi di Milano) Direttore Tecnico BIO BASIC EUROPE S.r.l.</p> <p>Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab <i>Project Responsible Bio Basic Lab</i> Dr.ssa 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)</p> <p>Responsabile Laboratorio Test in vitro Bio Basic Europe e Responsabile della Relazione <i>In vitro Tests Responsible Bio Basic Europe and Person responsible for the report</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)</p> <p>Sperimentatore Bio Basic Lab <i>Bio Basic Lab Experimenter</i> Dr.ssa Alice BUZZELLA Laurea in Biologia Sperimentale ed Applicata (Università degli Studi di Pavia)</p>	<p>INDICE INDEX</p> <p>Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3</p> <p>Scopo <i>Aim</i> pag. 3</p> <p>Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 4</p> <p>Risultati <i>Results</i> pag. 6</p> <p>Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 8</p>
--	--

Tutti i diritti sono riservati. Trattasi di documento tecnico scientifico protetto da Copyright.
Nessuna parte di esso può essere riprodotta in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta di Bio Basic Europe S.r.l.
In base alla nostra esperienza si consiglia di verificarne ogni 3 anni l'armonizzazione con eventuali aggiornamenti normativi.

*All rights are reserved, being it a scientific and technical document protected by Copyright.
No part of this document may be reproduced in any form without the prior written authorization of Bio Basic Europe S.r.l.
Based on our experience, we suggest to check every 3 years its compliance with the guidelines in force.*



Riassunto

E' stato eseguito un saggio di citotossicità preliminare (MTT) allo scopo di individuare le concentrazioni non citotossiche del prodotto su cui condurre il dosaggio delle proteine. Per il dosaggio delle proteine totali sono state prese in considerazione le concentrazioni di 0.05, 0.02 e 0.01 mg/ml, mentre cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo. Il dosaggio delle proteine è stato eseguito dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione con il prodotto testato.

Si è osservato che il contenuto di proteine nelle cellule trattate con il prodotto testato è significativamente superiore rispetto a quelle del controllo non trattato dopo 24 e 48 ore di incubazione per tutte le concentrazioni testate ad indicare una effettiva azione stimolante la sintesi proteica del prodotto testato.

SCOPO

Scopo del test è valutare la capacità del prodotto di stimolare la rigenerazione cellulare dei fibroblasti *in vitro*.

Abstract

We performed a cytotoxicity test (MTT) in order to choose the non-cytotoxic concentrations of the product to use for the dosage of proteins. For the protein assay we used the concentrations of 0.05, 0.02 and 0.01 mg/ml, while untreated cells were the negative control. The dosage of proteins was performed after 24, 48 and 72 hours of incubation with the tested product.

We observed that the protein content in the cells treated with the tested product is significantly higher than those of the untreated control after 24 and 48 hours of incubation for all the tested concentrations to indicate an effective stimulating action the protein synthesis of the tested product.

AIM

*The aim of test is to evaluate the ability of the cosmetic product to stimulate cellular regeneration of fibroblasts *in vitro*.*



MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Colture cellulari

Il test è stato condotto su fibroblasti umani (NHDF) coltivati in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) e 1% di antibiotici (penicillina e streptomicina) ed incubati in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO₂). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

Cell line and culture conditions

The test was performed on human fibroblast (NHDF) cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) and incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO₂). Good cell culture practices were used.

Campione testato / *Tested sample*

Estratto canapa sativa 50% cbd

Saggio MTT

La vitalità cellulare è stata valutata attraverso il 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.

E' stato eseguito un saggio MTT preliminare per individuare le concentrazioni di prodotto da utilizzare nel dosaggio delle proteine.

Valutazione della sintesi proteica

Un numero adeguato di cellule per ciascun trattamento sono state seminate in piastre da 6 pozzetti. L'incubazione delle cellule con le concentrazioni di prodotto scelte è stata effettuata per 24, 48 e 72 ore. Al termine dei trattamenti un ugual numero di cellule per ciascun trattamento è stato staccato, centrifugato, lavato in PBS e sottoposto a lisi per l'estrazione delle proteine totali. Si è quindi effettuato il dosaggio proteico. La lettura spettrofotometrica è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 570 nm.

MTT assay

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 presumably 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 decanted 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.

We performed a preliminary MTT test in order to identify the product concentrations to be used in the protein assay.

Evaluation of proteic synthesis

An appropriate number of cells for each treatment were seeded in 6 well plate. The cells were incubated with chosen concentrations of the tested product for 24, 48 and 72 hours. At the end of contact time the same number of cells for each treatment was detached, centrifuged, washed in PBS and lysed for extraction of total protein. The total protein assay was then performed. The spectrophotometric reading was performed at a wavelength of 570 nm.

RISULTATI

RESULTS

Valutazione preliminare della vitalità cellulare

Preliminary evaluation of cell viability

	SAMPLE (mg/ml)							
	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5	1,0
Cell viability (%)	94,37	93,68	85,57	86,42	77,31	60,95	6,12	5,08

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)

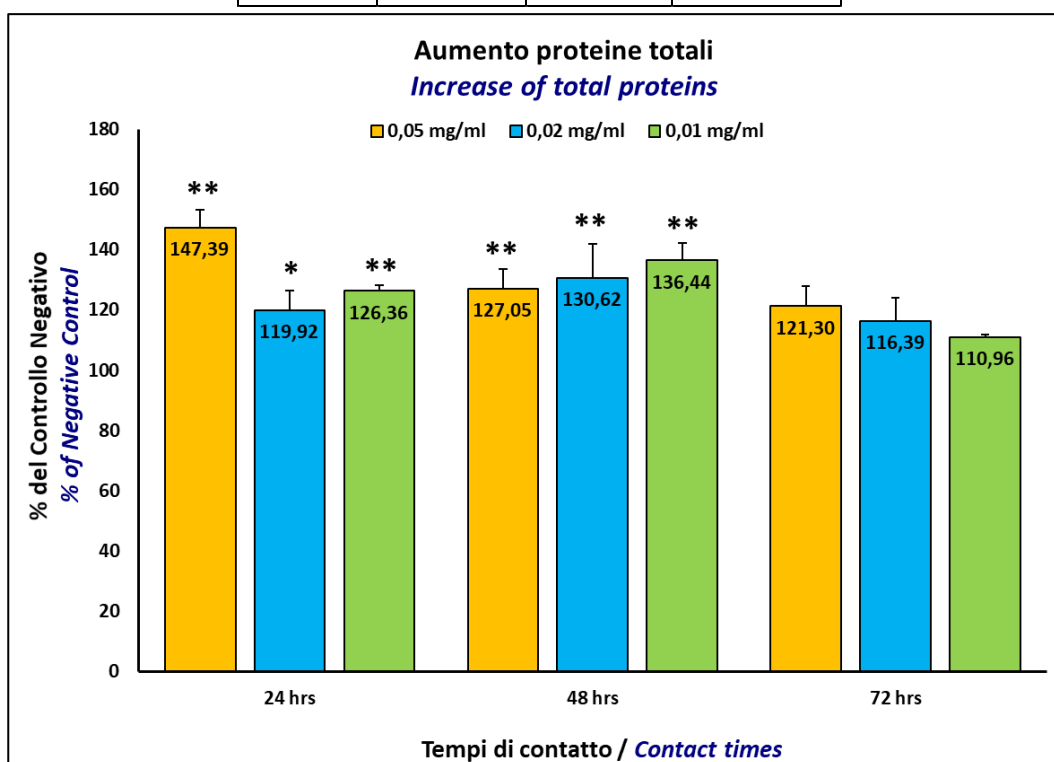
La vitalità cellulare dei fibroblasti trattati con il prodotto risulta paragonabile a quella dei fibroblasti non trattati per le concentrazioni testate comprese tra 0.0078 e 0.0625 mg/ml. Si è scelto di eseguire il dosaggio delle proteine considerando le concentrazioni di 0.05, 0.02 e 0.01 mg/ml

The cell viability of fibroblasts treated with the tested product is comparable to the one of untreated fibroblasts for tested concentrations between 0.0078 and 0.0625 mg/ml. We have chosen to perform the dosage of total proteins taking into consideration the concentrations of 0.05, 0.02 and 0.01 mg/ml

Valutazione della sintesi proteica

Evaluation of proteic synthesis

Aumento proteine totali (%) <i>Increase of total proteins (%)</i>			
Tempo <i>Time</i>	Campione (mg/ml) / <i>Sample (mg/ml)</i>		
	0,05	0,02	0,01
24 hrs	147,39	119,92	126,36
48 hrs	127,05	130,62	136,44
72 hrs	121,30	116,39	110,96



Il dosaggio proteico è stato effettuato su un numero uguale di cellule per ciascun trattamento. I valori di assorbanza misurati a 450 nm sono direttamente proporzionali alla quantità di proteine prodotte dalle cellule e sono stati interpolati con una curva standard di proteine. 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 $p < 0.05$. * $p < 0.05$ vs cellule di controllo non trattate; ** $p < 0.01$ vs cellule di controllo non trattate.

*Protein assay was performed on the same numbers of cells for each treatment. The absorbance values measured at 540 nm are directly proportional to the quantity of proteins produced cells and were interpolated to a curve of standard proteins. The values are expressed as means \pm standard deviation. Statistical data processing was performed by Student's t-test. We considered significant values of $p < 0.05$. * $p < 0.05$ vs untreated cells; ** $p < 0.01$ vs untreated cells.*

Il contenuto di proteine nelle cellule trattate con il prodotto è significativamente superiore rispetto al controllo non trattato dopo 24 e 48 ore per le concentrazioni testate di 0.05, 0.02 e 0.01 mg/ml.

The content of proteins in the cells treated with the product is significantly higher compared to the untreated control after 24 and 48 hours for tested concentrations of 0.05, 0.02 and 0.01 mg/ml.



CONCLUSIONI

Il campione denominato
Estratto canapa sativa 50% cbd

possiede attività rigenerante *in vitro* su colture cellulari di fibroblasti

Il prodotto stimola la sintesi proteica dopo 24 e 48 ore di incubazione
alle concentrazioni testate di 0.05, 0.02 e 0.01 mg/ml

CONCLUSIONS

The sample called
Estratto canapa sativa 50% cbd

has in vitro regenerating activity on fibroblasts cells coltures

The product stimulates protein synthesis
after 24 and 48 hours at tested concentrations of 0.05, 0.02 and 0.01 mg/ml