

**Valutazione *in vitro* dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di
agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita**

***In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive
agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis***

SANIFARMA srl

RESPINGO JELLYFISH SPRAY DM

Protocollo n° / *Report no.* **1710I27V**

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis

Protocollo n° / *Record no.* 1710I27V

SANIFARMA srl

<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 Sperimentazione <i>People in charge for the Experimentation</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) In vitro Tests Responsible BIO BASIC EUROPE S.r.l.</p> <p>Sperimentatore e Responsabile della Relazione <i>Experimenter 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) In vitro Tests Division BIO BASIC EUROPE S.r.l.</p>	<p>INDICE INDEX</p> <p>Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3</p> <p>Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4</p> <p>Scopo <i>Aim</i> pag. 6</p> <p>Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 7</p> <p>Risultati <i>Results</i> pag. 10</p> <p>Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 12</p> <p>Bibliografia <i>References</i> pag. 13</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.*

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis

Protocollo n° / Record no. 1710I27V

SANIFARMA srl

RIASSUNTO

L'effetto protettivo/filmante del prodotto testato valutato misurando la sua capacità di prevenire la formazione di citochine in tessuti di epidermide umana ricostruita (HRE). In particolare è stata valutata la sintesi di interleuchina-6 (IL-6). E' stato eseguito un saggio preliminare per verificare che il prodotto di per sé non alteri la vitalità dei tessuti. I tessuti HRE sono stati trattati con il prodotto testato e quindi stimolati con lipopolisaccaride (LPS), uno dei componenti della membrana cellulare esterna dei batteri Gram-negativi in grado di stimolare la produzione di IL-6. Sul terreno di mantenimento dei tessuti si effettuato il dosaggio della IL-6 tramite specifico kit ELISA. Al termine dell'esperimento è stato eseguito un nuovo test di vitalità cellulare per verificare che i trattamenti eseguiti non abbiano influenzato la vitalità dei tessuti.

Si è osservato che nei tessuti pretrattati con il prodotto testato la produzione di IL-6 è significativamente inferiore (29%) rispetto a quella nei tessuti stimolati ma non trattati. Si può concludere che il prodotto testato ha azione protettiva e filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa).

ABSTRACT

The protective/filming effect of the tested product was assessed by measuring its ability to prevent the formation of cytokines in reconstructed human epidermis (HRE) tissues. In particular, was evaluated the synthesis of interleukin-6 (IL-6). A preliminary test has been performed in order to verify that the product itself does not alter the viability of the tissues. HRE tissues were treated with the tested product and then stimulated with lipopolysaccharide (LPS), one of the components of the external cellular membrane of Gram-negative bacteria capable of stimulating IL-6 production. IL-6 was assayed on the tissue maintenance medium using a specific ELISA kit. At the end of the experiment a new cell viability test was performed in order to verify that the treatments performed did not influence the viability of the tissues.

We observed that in the tissues pretreated with the tested product the production of IL-6 is significantly lower (29%) than in the stimulated but untreated tissues. We can conclude that the tested product has protective and filming action against aggressive agents (jellyfish sting).

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.

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- α), citochine chemotattiche (come la IL-8) e citochine che promuovono la proliferazione cellulare (come la IL-6 e la IL-7).

La interleuchina-6 (IL-6) è una citochina che contribuisce alle difese immunitarie innate. E' inoltre essenziale per la produzione di anticorpi nelle cellule B. Nella pelle la IL-6 è prodotta costitutivamente e in seguito a danni da fibroblasti e cheratinociti, ma può anche essere sintetizzata da monociti e macrofagi in seguito ad attivazione antigenica. Dopo un danno meccanico alla pelle, l'espressione del RNA messaggero della IL-6 aumenta e svolge la sua azione sulle cellule dendritiche. Il collagene di medusa è in grado di attivare la risposta immunitaria perché facilita la produzione di IgM. In particolare, il collagene delle meduse stimola fortemente la produzione di TNF- α e interleuchina IL-6. Il collagene di medusa è in grado di stimolare il recettore toll like di tipo 4 (TLR4): è noto che questo tipo di recettore è in grado di attivare NF- κ B e di indurre la produzione di citochine proinfiammatorie come TNF- α e IL-6.

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis

Protocollo n°/ Record no. 1710I27V

SANIFARMA srl

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).

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- α), chemotactic cytokines (like IL-8) and growth promoting cytokines (like IL-6 and IL-7).

Interleukin-6 (IL-6) is a cytokine that contributes to innate immune defense. It is also essential for antibody production in B cells. In the skin IL-6 is produced constitutively and after injury by fibroblasts and keratinocytes, but can also be synthesized by monocytes and macrophages after antigen activation. After mechanical injury, IL-6 messenger RNA (mRNA) expression is upregulated in skin and exerts its effects on dendritic cells. Jellyfish collagen has a potential to improve the acquired immune response because it facilitates the production of IgM. In particular, jellyfish collagen highly stimulates production of TNF- α and interleukin IL-6. Jellyfish collagen is able to stimulate toll like receptor 4 (TLR4) that is well identified and well known to activate NF- κ B and to induce production of proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6.

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis

Protocollo n° / *Record no.* 1710I27V

SANIFARMA srl

SCOPO

Lo scopo del test è quello di valutare se il prodotto testato ha un'azione protettiva/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su epidermide umana ricostruita. Per questo motivo è stata testata la sua efficacia nel ridurre la sintesi di interleuchina-6 (IL-6) in tessuti stimolati con LPS e pretrattati con il prodotto testato.

AIM

The aim of the test is to evaluate if the product tested has a protective/filming action against aggressive agents (jellyfish sting) on reconstructed human epidermis. For this reason we tested its effectiveness in reducing the synthesis of interleukin-6 (IL-6) in tissues stimulated with LPS and pretreated with the tested product.

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di
agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
*In vitro evaluation of the protective/filming effect against
aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis*

Protocollo n° / *Record no.* 1710I27V

SANIFARMA srl

MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Tessuti

L'epidermide umana ricostruita è formata da cheratinociti umani normali coltivati su un filtro inerte di polycarbonato all'interfaccia aria-liquido in un mezzo di crescita chimicamente ben definito.

Tissues

Reconstructed Human Epidermis consists of normal human keratinocytes cultured on an inert polycarbonate filter at the air-liquid interface, in a chemically defined medium.

Campione testato / *Tested sample*

RESPINGO JELLYFISH SPRAY DM

INCI

aqua, cyclopentasiloxane, coco-caprylate, dicaprylyl ether, glycerin, polyglyceryl-3 diisostearate, undecane, lanthanum chloride, PEG/PPG-20/15 dimethicone, tridecane, dimethicone, plankton extract, glycosaminoglycans, sodium chloride, phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylene glycol, propylparaben.

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis

Protocollo n° / *Record no.* 1710I27V

SANIFARMA srl

Valutazione della vitalità cellulare

Prima e dopo del dosaggio delle citochine è stato condotto un saggio di vitalità cellulare, allo scopo di verificare che il prodotto ed il trattamento non alterino la vitalità dei tessuti. 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

I tessuti HRE sono stati trattati per 60 minuti \pm 1 minuto a temperatura ambiente secondo il seguente schema:

1. Tessuti non trattati e non stimolati (controllo negativo)
2. Tessuti stimolati con LPS
3. Tessuti trattati con il prodotto testato e stimolati con LPS

Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato.

Al termine del tempo di contatto il terreno è stato recuperato per il dosaggio della IL-6. Il contenuto di IL-6 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.

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis

Protocollo n° / Record no. 1710I27V

SANIFARMA srl

Evaluation of cell viability

A cell viability assay was performed prior and after the cytokines dosage in order to verify that the product and the treatment do not alter the viability of the tissues. The cell viability was evaluated through a MTT test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], a yellow compound that is bioreduced 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 HRE tissues were treated for 60 minutes ± 1 minute at room temperature according to the following scheme:

- 1. Untreated and non-stimulated tissues (negative control)*
- 2. Tissues stimulated with LPS*
- 3. Tissues treated with the tested product and stimulated with LPS*

Each experiment was conducted in triplicate

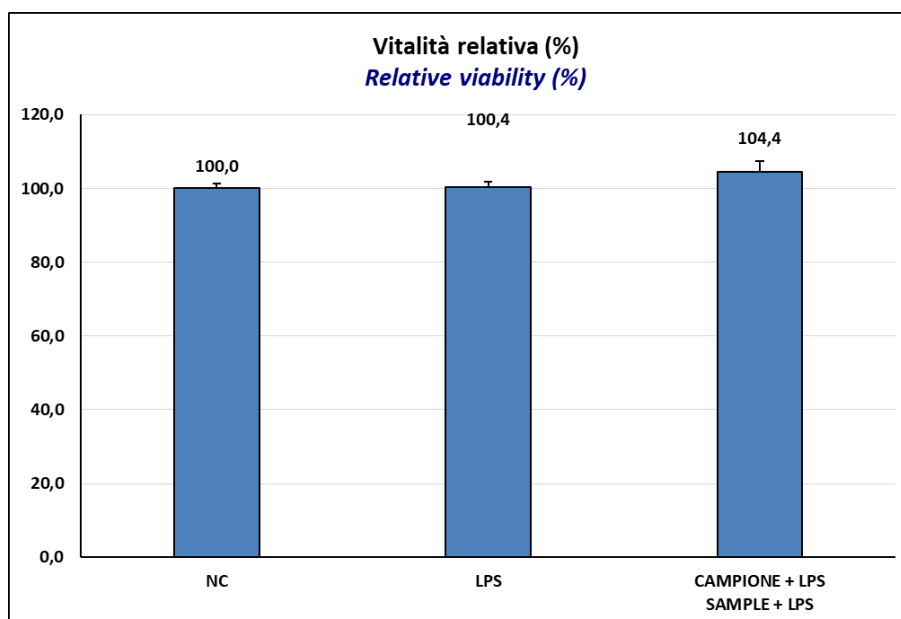
At the end of the contact time the culture medium was recovered for IL-6 dosage. The content of IL-6 in the culture medium was determined by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), a plate-based assay technique designed for detecting and quantifying substances such as peptides, proteins, antibodies 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

Controllo della vitalità dei tessuti al termine del trattamento

Control of tissues viability at the end of the treatment



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 (tessuti non trattati)

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 tissues)

Il trattamento con LPS e con il campione testato non determinano variazioni significative della vitalità dei tessuti

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

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis

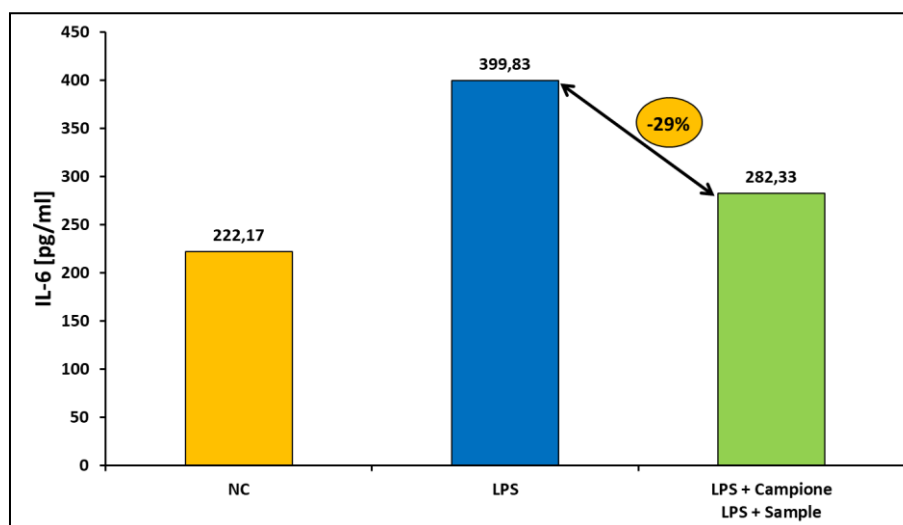
Protocollo n° / Record no. 1710127V

SANIFARMA srl

Dosaggio delle citochine

Dosage of cytokines

	NC	LPS	LPS + CAMPIONE <i>LPS + SAMPLE</i>
Valore medio IL-6 (pg/ml) <i>IL-6 mean value (pg/ml)</i>	222,17	399,83	282,33



L'assorbanza misurata a 450 nm è direttamente proporzionale alla quantità di IL-6 prodotta dai tessuti. I valori sono stati interpolati con una curva standard di IL-6 ed i risultati espressi come pg/ml.

The absorbance measured at 450 nm is directly proportional to the quantity of IL-6 produced by tissues. The values were interpolated in a standard curve of IL-6 and the results expressed as pg/ml.

In presenza del prodotto testato la quantità di IL-6 indotta da LPS diminuisce significativamente (29%)

In the presence of the tested product the LPS-induced IL-6 significantly decreases (29%)

CONCLUSIONI

Il campione denominato
RESPINGO JELLYFISH SPRAY DM

**è in grado di ridurre la sintesi di interleuchina 6 *in vitro*
su tessuti di epidermide umana ricostruita**

Il prodotto testato riduce la quantità di IL-6 indotta da LPS, il che porta a concludere la presenza di un'azione protettiva/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa)

CONCLUSIONS

The sample called
RESPINGO JELLYFISH SPRAY DM

***is able to reduce the synthesis of interleukin 6 in vitro
on reconstructed human epidermis tissues***

The product tested reduces the amount of IL-6 induced by LPS, and this leads to the conclusion of the presence of a protective/filming action against aggressive agents (jellyfish sting)



Il presente Rapporto di Prova è firmato digitalmente ai sensi della normativa vigente
This test report is digitally signed according to current legislation

Valutazione in vitro dell'effetto protettivo/filmante nei confronti di agenti aggressivi (puntura di medusa) su cute umana ricostruita
In vitro evaluation of the protective/filming effect against aggressive agents (jellyfish sting) on human reconstructed epidermis

Protocollo n° / Record no. 1710I27V

SANIFARMA srl

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- α 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 α 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
- Putra, A.B.N., Morishige, H., Nishimoto, S., Nishi, K., Shiraishi, R., Doi, M., Sugahara, T., 2012. Effect of collagens from jellyfish and bovine Achilles tendon on the activity of J774.1 and mouse peritoneal macrophage cells. *Journal of Functional Foods* 4, 504–512.
- Putra AB, Nishi K, Shiraishi R, Doi M, Sugahara T. Jellyfish collagen stimulates production of TNF- α and IL-6 by J774.1 cells through activation of NF- κ B and JNK via TLR4 signaling pathway. *Mol Immunol*. 2014; 58 (1): 32-7
- 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