

Valutazione della citotossicità di un prodotto mediante un saggio in vitro su colture cellulari di mucosa orale

***In vitro evaluation of the cytotoxicity
of a product through an assay
on oral mucosal cell cultures***

LA TABACCHERIA

**WHITE VIRGINIA EXTREME 4POD diluito in 40ml di base 60vg/40pg
per ottenere 60ml di prodotto finito 60pg/40vg**



RIASSUNTO / ABSTRACT	3
INTRODUZIONE / INTRODUCTION	4
SCOPO / AIM	6
MATERIALI E METODI / MATERIALS AND METHODS	7
Colture cellulari / Cell line and culture conditions	7
Campione testato / Tested sample	7
Preparazione dei campioni / Samples preparation	7
Esecuzione del test / Test execution	7
RISULTATI / RESULTS	8
Interpretazione dei risultati / Interpretation of results	8
Curva concentrazione-risposta di SDS (controllo positivo) / Concentration-response curve for SDS (positive control)	10
Curva concentrazione-risposta dello standard negativo / Concentration-response curve for negative standard	12
Curva concentrazione-risposta di / Concentration-response curve for	13
CONCLUSIONI / CONCLUSIONS	14
BIBLIOGRAFIA / REFERENCES	15



RIASSUNTO / ABSTRACT

Il saggio di citotossicità è stato eseguito su colture di cellule di mucosa orale KB trattate con concentrazioni scalari (diluizioni 1:2 a partire da 5.0 mg/ml) del prodotto da testare. Come controllo positivo è stato utilizzato il sodio dodecil solfato (SDS), una sostanza dai noti effetti citotossici, mentre come riferimento negativo è stato impiegato uno standard interno con $IC_{50} > 0.5$ mg/ml (sostanza non citotossica).

I risultati ottenuti non hanno mostrato una diminuzione della vitalità cellulare alle concentrazioni di prodotto testate con una $IC_{50} > 5.0$ mg/ml. Un valore di $IC_{50} > 0.5$ mg/ml indica la totale assenza di effetti citotossici del prodotto testato su colture cellulari di mucosa orale.

Di conseguenza il prodotto risulta privo di effetti citotossici su cellule di mucosa orale in vitro.

The cytotoxicity assay was performed on KB oral mucosal cell cultures treated with scalar concentrations (1:2 dilutions from 5.0 mg/ml) of the tested product. As positive control we used sodium dodecyl sulphate (SDS), a substance with well known cytotoxic effects, while the negative reference was an internal standard with $IC_{50} > 0.5$ mg/ml (no cytotoxic substance).

We didn't observe a decreased cell viability at tested concentrations with an $IC_{50} > 5.0$ mg/ml. An IC_{50} value > 0.5 mg/ml shows the absence of cytotoxic effects of the tested product on oral mucosal cell culture.

Therefore this product has no cytotoxic effects on oral mucosal cells in vitro.

TRUSTICERT SRL
R/O Via Mazzini 18/C - 22036 Erba (CO) Italy
C/O ComoNExT - Via Cavour 27 - 22074 Comazzo (CO) Italy
Registered Capital: 22.000
Società (VIES): IT03691110138
REA: CO-328080
trusticert@legalmail.it



INTRODUZIONE / INTRODUCTION

La citotossicità (cioè la proprietà di essere tossici per le cellule) è il risultato di una interferenza di una sostanza con strutture e/o proprietà essenziali per la sopravvivenza, la proliferazione e/o le funzioni delle cellule stesse. Questi effetti possono coinvolgere per esempio l'integrità delle membrane e del citoscheletro, il metabolismo, la sintesi, la degradazione o il rilascio di costituenti cellulari, la regolazione ionica e la divisione cellulare. Si possono distinguere tre diversi tipi di citotossicità: (1) citotossicità basale (o generale) che coinvolge una o più delle strutture o processi sopra menzionati e colpisce indistintamente tutte le cellule; (2) citotossicità selettiva (o cellulo-specifica) che si ha quando alcune cellule differenziate sono più sensibili rispetto ad altre all'effetto di una specifica sostanza tossica; (3) tossicità che colpisce alcune funzioni cellulari specifiche e che potrebbe non essere critica per la sopravvivenza della singola cellula ma danneggiare tessuti ed organismo (per esempio questo tipo di tossicità potrebbe colpire la comunicazione tra cellule).

Sono stati sviluppati fino ad oggi numerosi test di citotossicità in vitro che utilizzano diverse linee cellulari e che misurano differenti endpoint. Il test MTT qui proposto è un saggio di riduzione utilizzato per determinare il livello di attività metabolica nelle cellule eucariotiche. Si tratta di uno dei test di citotossicità più diffusi grazie alla sua semplicità, accuratezza e riproducibilità. La base chimica del saggio è la riduzione dell'MTT, un composto tetrazolico [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. MTT è una sostanza gialla che forma in seguito a riduzione un sale di formazano color viola. Il processo avviene principalmente nel citoplasma e secondariamente nei mitocondri e a livello della membrana plasmatica.

L'attività delle reduttasi che catalizzano la reazione è altamente dipendente dalla concentrazione di NADH e di NADPH intracellulari, i cui livelli sono associati alla disponibilità di glucosio extracellulare. Anche la succinato deidrogenasi mitocondriale ed il citocromo C prendono parte alla riduzione di MTT. Pertanto qualsiasi sostanza o trattamento che interferisca con questi enzimi o con la glicolisi influenzerebbe la riduzione dell'MTT e di conseguenza altererebbe i risultati della conta cellulare. Come conseguenza di questi processi metabolici di riduzione si vengono quindi a formare nel giro di poche ore dei cristalli viola scuro di formazano. Tali cristalli possono essere solubilizzati in differenti solventi organici, principalmente alcoli. Un aumento o una riduzione nel numero di cellule determinerà



un'analoga variazione nella quantità di formazano formatasi, dando così una indicazione del grado di citotossicità del prodotto testato.

The cytotoxicity (i.e. the quality of being toxic to cells) is the result of an interference of a substance with structures and/or properties essential for cell survival, proliferation and/or function. These effects can involve, for example, the integrity of membranes and the cytoskeleton, metabolism, the synthesis and degradation or release of cellular constituents or products, ion regulation and cell division. It is useful to distinguish between three types of cytotoxicity: (1) basal (or general) cytotoxicity involves one or more of the above-mentioned structures or processes, when all of the cell types studied show similar sensitivities; (2) selective (or cell-specific) cytotoxicity occurs when some types of differentiated cells are more sensitive to the effects of a particular toxicant than others; (3) cell-specific function toxicity occurs when the toxicant affects structures or processes that may not be critical for the affected cells themselves, but which are critical for the organism as a whole (for example, such toxicity can involve effects on cell-to-cell communication).

A large number of in vitro cytotoxicity tests have been developed, employing a variety of cell lines and endpoint measurements. The MTT here proposed is a reduction assay used to determine the level of metabolic activity in eukaryotic cells. It is one of the most common cytotoxicity tests because it is simple, accurate and gives reproducible results. The chemical basis of the assay is the reduction of the MTT, a type of tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. MTT is a slightly yellow substance, which forms a purple formazan upon reduction. The process primarily takes place in the cytoplasm, and to a lesser extent in the mitochondria and cell membrane. The reductase activity is highly dependent on the concentration of intracellular NADH and NADPH and the abundance of these nucleotide cofactors is associated with the availability of extracellular glucose. The mitochondrial succinate dehydrogenase and cytochrome c take part in MTT reduction as well. Therefore, any substance or treatment that interferes with these enzymes or with glycolysis, changes the rate of MTT reduction, and consequently alters the result of cell counting. As a consequence of these metabolic processes, dark purple needle-like formazan crystals appear, radiating from the cells in a few hours. Formazan crystals can be solubilized by mixing thoroughly in different organic solvents, mainly alcohols. 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 tested material.



SCOPO / AIM

Il saggio MTT è stato condotto allo scopo di valutare il potenziale effetto citotossico di un prodotto su una linea cellulare di cellule di mucosa orale KB.

The MTT test was carried out in order to evaluate the potential cytotoxic effect of a product on KB oral mucosal cell line.

MATERIALI E METODI / MATERIALS AND METHODS

Colture cellulari / Cell line and culture conditions

Il monostrato di cellule di mucosa orale KB è altamente rappresentativo del tessuto target in vivo. Le cellule KB sono state coltivate in Earle's MEM (minimal essential medium in sali di Earle) supplementato con siero fetale bovino (10%) ed incubate in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO₂). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

KB oral mucosal cells monolayers are highly representative of the target tissue in vivo. KB cells were cultured in Earle's MEM (minimal essential medium in Earle's salts) supplemented with fetal bovine serum (10%) and incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO₂). Good cell culture practices were used.

Campione testato / Tested sample

WHITE VIRGINIA EXTREME 4POD diluito in 40ml di base 60vg/40pg per ottenere 60ml di prodotto finito 60pg/40vg

INCI: Glicole propilenico, glicerina vegetale, Estratto di tabacco

Preparazione dei campioni / Samples preparation

Il campione in esame è stato sciolto e quindi diluito in terreno di crescita fino alle concentrazioni finali desiderate comprese tra 0.0391 e 5.0 mg/ml. Il riferimento negativo (standard interno) è stato testato alle concentrazioni comprese tra 0.0391 e 5.0 mg/ml, mentre il controllo positivo (SDS) è stato testato alle concentrazioni comprese tra 0.00313 e 0.4 mg/ml.



The tested sample was dissolved and then diluted in culture medium to the desired final concentrations between 0.0391 and 5.0 mg/ml. The negative reference (internal standard) was tested at concentrations between 0.0391 and 5.0 mg/ml, while the positive control (SDS) was tested at concentrations between 0.00313 and 0.4 mg/ml.

Esecuzione del test / Test execution

Un adeguato numero di cellule è stato seminato in piastre da 96 pozzetti. Una volta raggiunto un monostrato semi confluyente, le cellule sono state trattate con le diverse concentrazioni del campione testato e degli standard ed incubate per 24 ore a condizioni standard. Cellule non trattate e mantenute in terreno di coltura rappresentano i controlli negativi. Dopo 24 ore di contatto le piastre sono state esaminate al microscopio a contrasto di fase, il terreno è stato delicatamente rimosso da ciascun pozzetto, le cellule sono state quindi 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 570 nm.

A suitable number of cells was seeded in 96 wells plates. Once a half-confluent monolayer has been reached, the cells were treated with the different dilutions of the tested sample or of the standards and incubated for 24 hours at standard culture conditions. Not treated cells maintained in culture medium are negative controls. After a 24 hours-period contact, the plates were examined under a phase contrast microscope, the culture medium was carefully removed from each well and 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 570 nm wavelength.



RISULTATI / RESULTS

Interpretazione dei risultati / Interpretation of results

L'inibizione della vitalità cellulare ad ogni concentrazione testata è stata espressa come percentuale rispetto al controllo negativo (cellule non trattate) secondo la seguente formula:

$$\text{Inibizione \%} = 100 - [(OD_X / OD_{NC}) \times 100]$$

OD_X Densità ottica media delle cellule trattate con il campione in esame alla concentrazione X

OD_{NC} Densità ottica media dei controlli negativi

I valori così calcolati sono stati messi in grafico contro le concentrazioni stesse. Le curve concentrazione-risposta ottenute permettono di estrapolare sia per i campioni che per gli standard il valore di IC50 teorico.

Il valore IC50 indica la concentrazione del composto testato necessaria per inibire la vitalità cellulare del 50%. IC50 è un parametro che consente di valutare la citotossicità di un composto secondo lo schema seguente:

The inhibition of cell viability at each tested concentration is expressed as percentage of negative control (not treated cells) according to the following formula:

$$\text{Inhibition \%} = 100 - [(OD_X / OD_{NC}) \times 100]$$

OD_X Mean optical density of cells treated with test sample at X concentration

OD_{NC} Mean optical density of negative control

The calculated values are plotted against the concentrations. The concentration-response curves for both standards and tested product allow to extrapolate the theoretical IC50 value (Inhibiting Concentration 50).

The IC50 value is the concentration of a test compound which inhibits cell growth/survival by 50%. IC50 is a parameter that allows to evaluate the cytotoxicity of a compound according to the following scheme:



Valore di IC50 IC50 value	Interpretazione Interpretation
$IC_{50} \leq 0.5 \text{ mg/ml}$	Effetto citotossico Cytotoxic effect
$IC_{50} > 0.5 \text{ mg/ml}$	Assenza di effetto citotossico Absence of cytotoxic effect

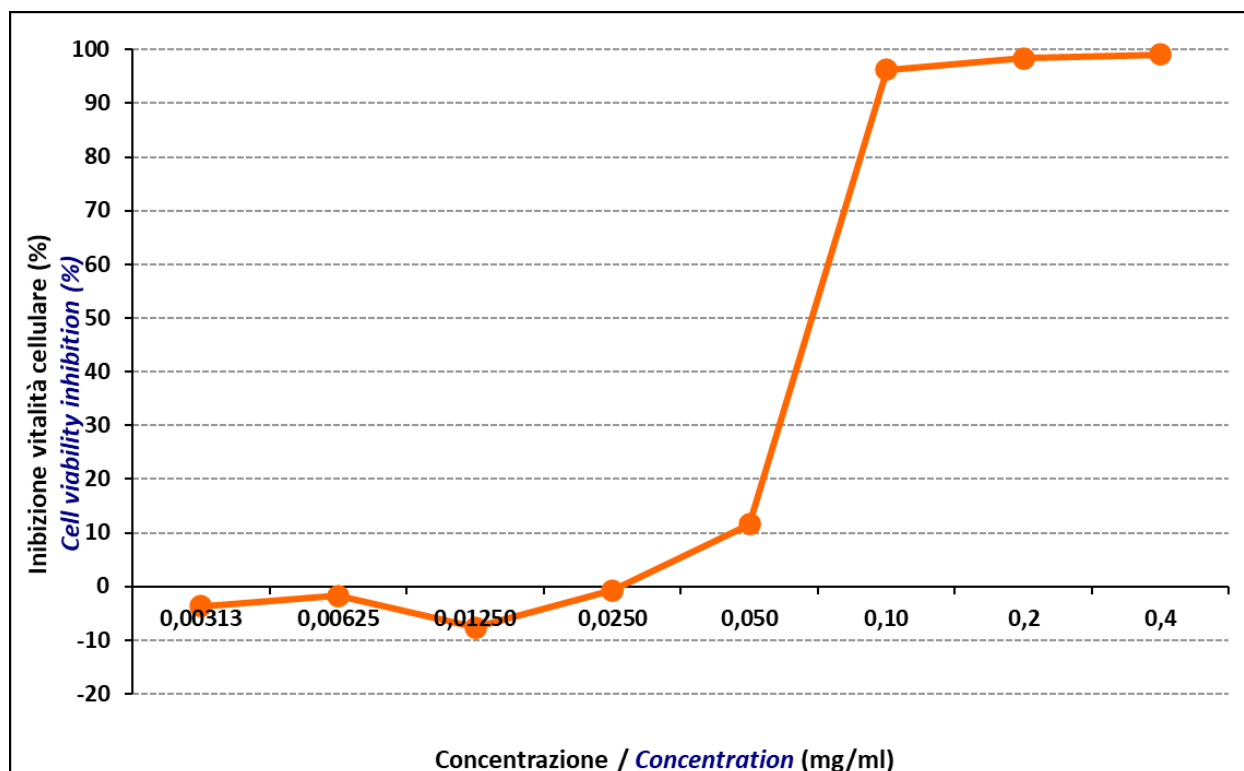
Curva concentrazione-risposta di SDS (controllo positivo) /

Concentration-response curve for SDS (positive control)

Concentrazione (mg/ml) Concentration (mg/ml)	Inibizione della vitalità cellulare (%) Inhibition of cell viability (%)
0.4	99.04
0.2	98.35
0.1	96.23
0.05	11.57
0.025	Assenza di inibizione / No inhibition*
0.0125	
0.00625	
0.00313	
	$IC_{50} = 0.067 \text{ mg/ml}$

* Diminuzione della vitalità cellulare <10% = non significativa / Decrease of cells viability <10% = unsignificant





Le concentrazioni testate comprese tra 0.4 e 0.05 mg/ml hanno diminuito significativamente la vitalità cellulare. Un valore di $IC_{50} \leq 0.5$ mg/ml indica un effetto citotossico.

Tested concentrations between 0.4 and 0.05 mg/ml have significantly decreased cell viability. An IC_{50} value ≤ 0.5 mg/ml means cytotoxic effect.



Curva concentrazione-risposta dello standard negativo / *Concentration-response curve for negative standard*

Concentrazione (mg/ml) Concentration (mg/ml)	Inibizione della vitalità cellulare (%) Inhibition of cell viability (%)
5.0	Assenza di inibizione / No inhibition*
2.5	
1.25	
0.625	
0.313	
0.156	
0.0781	
0.0391	
	IC ₅₀ > 5.0 mg/ml

* Diminuzione della vitalità cellulare <10% = non significativa / Decrease of cells viability <10% = insignificant

Nessuna delle concentrazioni testate ha diminuito significativamente la vitalità cellulare. Un valore di IC₅₀ > 0.5 mg/ml indica assenza di effetto citotossico.

None of the tested concentrations has significantly decreased cells viability. An IC₅₀ value > 0.5 mg/ml means absence of cytotoxic effect.



Curva concentrazione-risposta di / *Concentration-response curve for*
WHITE VIRGINIA EXTREME 4POD diluito in 40ml di base 60vg/40pg per ottenere
60ml di prodotto finito 60pg/40vg

Concentrazione (mg/ml) Concentration (mg/ml)	Inibizione della vitalità cellulare (%) Inhibition of cell viability (%)
5.0	Assenza di inibizione / No inhibition*
2.5	
1.25	
0.625	
0.313	
0.156	
0.0781	
0.0391	
	IC50 > 5.0 mg/ml

* Diminuzione della vitalità cellulare <10% = non significativa / Decrease of cells viability <10% = insignificant

Nessuna delle concentrazioni testate ha diminuito significativamente la vitalità cellulare. Un valore di IC50 > 0.5 mg/ml indica assenza di effetto citotossico.

None of tested concentrations has significantly decreased cells viability. An IC50 value > 0.5 mg/ml means absence of cytotoxic effect.



CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

Il campione denominato **WHITE VIRGINIA EXTREME 4POD** diluito in 40ml di base 60vg/40pg per ottenere 60ml di prodotto finito 60pg/40vg non diminuisce la vitalità cellulare alle concentrazioni testate su cellule di mucosa orale in vitro con un valore di $IC_{50} > 5.0$ mg/ml. Un valore di $IC_{50} > 0.5$ mg/ml indica assenza di effetto citotossico.

Di conseguenza il prodotto risulta privo di effetti citotossici su cellule di mucosa orale in vitro.

*The sample called **WHITE VIRGINIA EXTREME 4POD** diluito in 40ml di base 60vg/40pg per ottenere 60ml di prodotto finito 60pg/40vg has not proved to decrease cell viability at tested concentrations on oral mucosal cells in vitro with a value of $IC_{50} > 5.0$ mg/ml. An IC_{50} value > 0.5 mg/ml means absence of cytotoxic effect. **Therefore this product has no cytotoxic effects on oral mucosal cells in vitro.***



BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

- Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with tmre, jc-1, and nao mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 2002; 47(4): 236–242
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4: 14–19
- Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (mtt): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in mtt reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303(2):474–482
- Denizot F, Lang RJ. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Immunol Methods* 1986; 89(2): 271–7
- Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods* 1990; 131(2): 165–72
- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94 (1-2): 57–63
- Kupcsik L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 13–9
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55–63
- Seibert H, Balls M, Fentem JH, Bianchi V, Clothier RH, Dierickx PJ, Ekwall B, Garle MJ, Gumez-Lechun MJ, Gribaldo L, Iden M, Kiebsch M, Rasmussen E, Roguet R, Shrivastava R, Walum E. Acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. The report and recommendations of ECVAM workshop 16. *ATLA* 1996; 24: 499–510.
- Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. iii. points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 1963; 77: 383–393
- Spinner DM. MTT growth assays in ovarian cancer. *Methods Mol Med* 2001; 39: 175–7

