



**I.Z.S. DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA-ROMAGNA**  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

**REPARTO RICERCA APPLICATA AI  
SUBSTRATI CELLULARI**

VIA A. BIANCHI, 7-9 - 25124 BRESCIA (ITALIA)  
TEL. ++ 03022901 TELEFAX ++ 030225613



Ricerca - Sviluppo - Valutazione  
Documentazione Dermo-cosmetologica  
Via Antonio Panizzi, 10  
20146 Milano (Italy)  
Tel. (039 2) 4155729 tel/fax (039 2) 4150184

*VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ RIGENERANTE*

*DI UN PRODOTTO FITOTERAPICO*

*ATTRAVERSO SPERIMENTAZIONI IN VITRO SU*

**TQ** **Taki Quik**  
*Lipogel*

*Luogo e data di emissione: Brescia – 3 Febbraio 2003.*

## ***Titolo***

Valutazione dell'attività rigenerante di un prodotto fitoterapico attraverso sperimentazioni in vitro su colture cellulari di cheratinociti, fibroblasti e tessuto osseo (Test MTT).

## ***Scopo***

Il saggio MTT può essere eseguito al fine di valutazione l'eventuale attività rigenerante di un prodotto su colture cellulari. Il test in vitro risulta essere un metodo sperimentale in grado di dare molte informazioni sulle reazioni che possono verificarsi in vivo.

## ***Sponsor***

OAXIS  
Via Rizzotto, 3/A  
00043 Ciampino (RM)

## ***Monitor***

Dott.ssa Elena BOCCHIETTO  
Biologa specialista in Applicazioni Biotecnologiche/Consulente per:  
BIO BASIC EUROPE S.r.l.  
Tel. (02) 4155729  
Fax. (02) 4150184

## ***Controllo qualità***

Dr. Claudio ANGELINETTA  
Direttore Tecnico  
BIO BASIC EUROPE S.r.l.  
Tel. (02) 4155729  
Fax. (02) 4150184

## ***Sperimentatore***

Dott.ssa Nadia Losio  
Centro Ricerca applicata ai Substrati Cellulari  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia.  
Via A. Bianchi 7/9  
25124 Brescia  
Tel. (030) 22901  
Fax. (030) 225613

## ***Valutazione dell'attività rigenerante di un prodotto fitoterapico attraverso sperimentazioni in vitro su colture cellulari di cheratinociti, fibroblasti e tessuto osseo***

Il cheratinocita è il principale tipo cellulare che compone l'epidermide e partecipa attivamente a tutti gli aspetti funzionali che caratterizzano. I cheratinociti utilizzati negli esperimenti in vitro qui condotti sono di tipo primario, cioè provengono da una biopsia di cute sana di un donatore.

I fibroblasti sono presenti nel derma, lo strato cutaneo sottostante l'epiderme, il loro compito è quello di sintetizzare il collagene e le altre fibre che compongono la matrice extracellulare del derma.

I fibroblasti che sono stati utilizzati sono di tipo primario, derivati da derma umano.

Per questi esperimenti sono state inoltre utilizzate cellule di tessuto osseo provenienti da osteosarcoma umano. La vitalità delle cellule esposte in vitro a diverse concentrazioni di prodotto viene valutata rispetto a cellule non trattate, mediante la metodica MTT.

Il saggio MTT è semplice, accurato e da risultati riproducibili. Questo metodo è stato sviluppato in origine da Mossman (1993).

Il componente più importante è il 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromuro o MTT. Questo prodotto ha un colore giallognolo in soluzione. La deidrogenasi mitocondriale di cellule vitali rompe l'anello tetrazolico, portando alla formazione di cristalli color porpora insolubili in soluzioni acquose. I cristalli sono ridisciolti in isopropanolo acidificato e la soluzione purpurea risultante è misurata spettrofotometricamente. Un aumento o una diminuzione nel numero delle cellule, in concomitanza con le variazioni nella quantità di formaz. formaz., indicano il grado di citossicità o l'eventuale attività rigenerante della sostanza testata.

## ***Materiali e Metodi***

### Preparazione dei campioni

Le cellule in coltura sono trattate con concentrazioni scalari del prodotto testato comprese tra 0,002 e 10 mg/ml.

### Colture cellulari

Si sono utilizzate colture di:

Cheratinociti provenienti da biopsie di pelle umana.

Fibroblasti, provenienti da derma umano,

Cellule di tessuto osseo provenienti da osteosarcoma umano

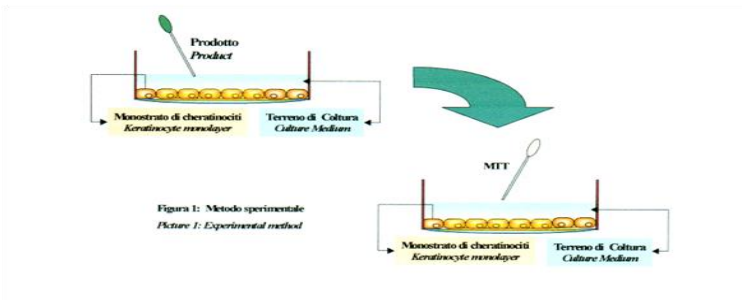
Le cellule sono state seminate in maniera omogenea in piastre da 96 pozzetti per l'esecuzione degli esperimenti.

## ***Terreno di coltura***

I cheratinociti sono stati incubati in CEC + in presenza di siero fetale bovino (FCS) al 3%. I fibroblasti sono stati incubati in MEM (Minimal Essential Medium) - Sodio - Piruvato + 5% di siero fetale bovino (FCS). Le cellule di tessuto osseo sono state incubate in Mc COY'S + 5% di siero fetale bovino (FCS).

## Esecuzione del test

Un numero adeguato di cellule (10.000 cell/pz per cheratinociti e fibroblasti e 15.000 cell/pz per le cellule di tessuto osseo) viene seminato nei pozzetti (piastra da 96 pozzetti, 150 µ/pozzetto di



Rielaborazione dei dati sperimentali forniti dal Centro Ricerca applicata ai Substrati Cellulari –Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna-Brescia.

## STIMOLAZIONE DELLA CRESCITA CELLULARE

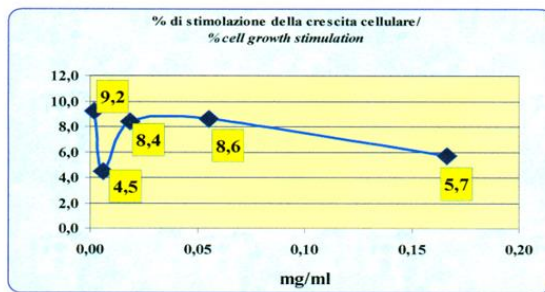
### CHERATINOCITI

Nelle condizioni di crescita analizzate concentrazioni di prodotto comprese tra 0,078 e 10 mg/ml dopo 24- 72 ore di incubazione non hanno dimostrato di possedere un’attività stimolante la crescita cellulare.

### FIBROBLASTI

Dopo 48 ore di incubazione con il campione

Concentrazione del campione(mg/ml)	Stimolazione della crescita cellulare (%)
0,167	5,7
0,056	8,6
0,019	8,4
0,006	4,5
0,002	9,2

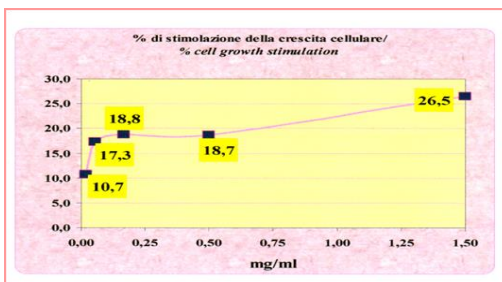


L'attività stimolante la crescita cellulare risulta essere presente solo per le concentrazioni di prodotto comprese tra 0,002 – 0,167 mg/ml.

### TESSUTO OSSEO

Dopo 24 ore di incubazione con il campione

Concentrazione del campione (mg/ml)	Stimolazione della crescita cellulare (%)
1,5	26,5
0,5	18,7
0,167	18,8
0,056	17,3
0,019	10,7



L'attività stimolante la crescita cellulare risulta essere significativa per le concentrazioni di prodotto comprese tra 0,019 -1,5 mg/ml.

**RIEPILOGO DEI DATI RILEVATI E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ RIGENERANTE DEL PRODOTTO  
SOTTOPOSTO ALLA SPERIMENTAZIONE**

*Il campione testato*



**DIMOSTRA DI AVERE  
ATTIVITA' RIGENERANTE SU COLTURE CELLULARI  
DI TESSUTO OSSEO DI PROVENIENZA UMANA**

**DOPO 24 ORE DI INCUBAZIONE IL CAMPIONE RISULTA AVERE UNA MAGGIORE ATTIVITA'  
RIGENERANTE A CONCENTRAZIONI COMPRESSE TRA 0,019 E 1,5 MG/ML.**

**NELLE CONDIZIONI DI CRESCITA ANALIZZATE IL PRODOTTO HA DIMOSTRATO DI POSSEDERE  
UN'ATTIVITA' STIMOLANTE LA CRESCITA CELLULARE SIGNIFICATIVA SU FIBROBLASTI**

Controllo Qualità/Quality Control

Dr. Claudio ANGELINETTA