



Università Degli Studi Di Ferrara
Via L. Borsari, 46. 44121 FERRARA

REPORT METODO ISO 11993-5:2009 BIOLOGICAL EVALUATION “*in vitro*”: cytotoxicity test

**Valutazione “*in vitro*” della valutazione biologica di un dispositivo medico:
Prova di citotossicità in base al metodo UNI EN ISO 11993-5**

*According the method UNI EN ISO 11993-5 the biological evaluation “*in vitro*” of
medical device: test in vitro cytotoxicity.*

PRODOTTO / PRODUCT:

PCL RESINA

COMMITTENTE / CUSTOMER:

ADVIHAIR S.R.L.
Via Benini, 11
ZOLA PREDOSA (BO)

Data report: 20/06/2013 / Date: June 20th 2013
Revisione 1: 15/07/2013
Revisione 2: 08/08/2013

NORMA EUROPEA **UNI EN ISO 10993-5:2009**
Valutazione "in vitro" della valutazione biologica di un dispositivo medico: Prova di citotossicità in base al metodo descritto dalla norma UNI EN ISO 11993-5

EUROPEAN STANDARD *UNI EN ISO 10993-5:2009*
According the Method UNI EN ISO 11993-5 the biological evaluation "in vitro" of medical device: cytotoxicity test.

The international standard's for all materials and product by the international biocompatibility standard ISO 10993-5, "Guidance on the Selection of Tests, specific tests that can be used to satisfy these requirements are then provided in ISO 10993-5, both sensitization and irritation.

PRODOTTO IN **PCL RESINA**
ESAME / TEST
PRODUCT **ADVIHAIR S.R.L.**
Via Benini, 11
ZOLA PREDOSA (BO)



Università Degli Studi Di Ferrara
Via L. Borsari, 46. 44121 FERRARA

INDICE: /CONTENTS:

1	INTRODUZIONE/ <i>FOREWORD</i>	4
2	TERMINI E DEFINIZIONI/ <i>TERMS AND DEFINITIONS</i>	5
3	CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME / <i>PRODUCT IDENTITY</i>	6
4	METODO DI PROVA A CONTATTO DIRETTO / <i>METHOD TEST A DIRECT CONTACT</i>	6
4.1	MATERIALI E REAGENTI / <i>MATERIALS AND REAGENTS</i>	7
4.2	APPARECCHIATURA / <i>MICROBIOLOGICAL LABORATORY EQUIPMENT</i>	8
5	DETERMINAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ/ <i>EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY</i>	9
5.1	VALUTAZIONE QUALITATIVA / <i>EVALUATION QUANTITATIVE</i>	9
5.2	VALUTAZIONE QUANTITATIVA: TEST MTT/ <i>EVALUATION QUANTITATIVE: TEST MTT</i>	9
5.3	ESPRESSIONE DEI RISULTATI / <i>EXPRESSION OF RESULTS</i>	10
5.4	METODO: PROVA PER CONTATTO DIRETTO / <i>CONTACT TEST METHOD</i>	11
5.4.1	PREPARAZIONE DELLA COLTURA CELLULARE / <i>PREPARATION OF THE CELL CULTURE</i>	11
5.4.2	PREPARAZIONE DEL PRODOTTO DI PROVA/ <i>PREPARATION OF THE TEST PRODUCT</i>	11
6	RISULTATI/ <i>RESULTS</i>	12
6.1	Risultati valutazione qualitativa / <i>Results evaluation qualitative</i>	12
6.2	Risultati valutazione quantitativa cellule VERO / <i>Results evaluation quantitative VERO cell</i>	13
6.3	Risultati valutazione quantitativa cellule Balb 3T3 / <i>Results evaluation quantitative Balb 3T3 cell</i>	14
7	CONCLUSIONI/ <i>CONCLUSIONS</i>	15

1 INTRODUZIONE / FOREWORD

UNI EN ISO 10993-5 2009.

La presente parte della ISO 10993-5 descrive i metodi di prova per valutare la citotossicità "in vitro" dei prodotti dispositivi medici che vengono a contatto con la cute umana oppure che devono essere applicati sulla cute o mucosa umana, e consente di determinare l'eventuale effetto citotossico del prodotto in esame, impiegando specifiche colture cellulari coltivate "in vitro".

Questo metodo specifica che il prodotto è posto ad incubare a diretto contatto con le cellule in coltura o tramite una tecnica di diffusione del prodotto in esame. Il protocollo di analisi è stato studiato per determinare la risposta biologica "in vitro" di colture cellulari composte da cellule di mammifero, utilizzando appropriati parametri biologici.

La determinazione della citotossicità può essere raggruppata in categorie a seconda del tipo di valutazione:

- a) valutazioni del danno cellulare tramite mezzi morfologici;
- b) misurazioni del danno cellulare;
- c) misurazioni della crescita cellulare;
- d) misurazioni di aspetti specifici del metabolismo cellulare.

This European standard ISO 10993-5 specifies test method and minimum requirements to evaluate the cytotoxicity of chemical substance for different applications in various fields (medical, cosmetic, ecc.).

Under this standard, the test medical device product is tested using in vitro cell culture under defined test conditions, including temperature and contact time, to demonstrate the possible cytotoxic effect and to determine the biological response of mammalian cells in vitro using appropriate biological parameters.

The determination of cytotoxicity depending on the type of evaluation the following:

- a) assessments of cell damage by morphological means;*
- b) measurements of cellular damage;*
- c) measurements of cell growth;*
- d) measurements of specific aspects of cellular metabolism.*

2 TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS

- 2.1 Controllo negativo: campione che sottoposto a prova in conformità alla presente parte della ISO 10993 non produce una risposta citotossica.

Negative control: sample tested in accordance with this part of ISO 10993 does not produce a cytotoxic response.

- 2.2 Controllo positivo: campione che, quando sottoposto a prova in conformità alla presente parte della ISO 10993 produce una risposta citotossica riproducibile.

Positive control: sample when tested in accordance this part of ISO 10993 produces a cytotoxic response playable.

- 2.3 Contenitori per colture cellulari : contenitori appropriati per le colture cellulari che comprendono piastre in plastica multi pozzetti , fiaschette T25 (flasks per colture cellulari), ecc.

Containers for cell cultures: plastic multi-well plates, T25 flasks (for cell culture flasks, etc.).

- 2.4 Citotossicità:alterazione morfologica delle cellule e/o la loro distruzione o una loro ridotta sensibilità causata dal prodotto in esame. /

Cytotoxicity: morphological alteration of cells and/or destruction or their reduced sensitivity caused by the product test.

3 **CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE DISPOSITIVO MEDICO
IN ESAME**
IDENTIFICATION OF THE TEST MEDICAL DEVICE SAMPLE

Denominazione della formulazione in esame:

PCL RESINA

Dispositivo medico: adesivo per epitesi capillari
Condizioni di stoccaggio: Temperatura ambiente.

Description of the sample: **PLC RESINA**

Medical device: adhesive epithesis capillaries
Storage conditions: Room temperature.

DITTA PRODUTTRICE: / MANUFACTURING COMPANY:

ADVIHAIR S.R.L.

Via Benini, 11
ZOLA PREDOSA (BO)

Data ricevimento campione: 15/05/2013

Periodo di Analisi:

Data inizio del test: 20-05-2013 + Data fine test 18-06-2013.

Period of analysis: 2013-05-20 to 2013-06-18.

Data report: 20/06/2013 / Date: June 20th 2013

4 **METODO DI PROVA A CONTATTO DIRETTO /
TEST METHOD A DIRECT CONTACT**

Il metodo di prova della norma ISO 10993-5 2009 riguarda la valutazione del potenziale irritante *in vitro* di un dispositivo medico solido su cellule di derivazione cutanea.

Il potenziale citotossico del prodotto da sottoporre a test a contatto diretto è stato valutato su linee cellulari di derivazione cutanea: fibroblasti umani.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT.

L'MTT è un sale di tetrazolio dal colore giallo, che ridotto dall'enzima succinato deidrogenasi forma un precipitato blue di formazano nei mitocondri delle cellule vitali. Il formazano precipitato è un indicatore della vitalità cellulare.

The test method of ISO 10993-5 2009 is irritation potential assay of a medical device in vitro on cells derived from skin. The cytotoxic potential of the product to be tested was assessed on cell lines derived from skin: human fibroblasts. Cell viability was assessed by MTT assay. The tetrazolium salt MTT is a yellow color, which reduced by the enzyme succinate dehydrogenase form a precipitate of blue formazan in the mitochondria of viable cells. The precipitate formazan is an indicator of cell viability.

4.1 MATERIALI E REAGENTI / MATERIALS AND REAGENTS

4.1.1 COLTURE CELLULARI / CELL CULTURES:

Le linee cellulari indicate dalla norma ISO 10993-5 utilizzate sono le seguenti:

CCL 81 (Vero) fibroblasti *

Balb/3T3 clone A31*

* linee cellulari American Type Culture Collection.

The cell lines indicated in ISO 10993-5 are as follows:

*CCL 81 (Vero) fibroblasts **

*Balb/3T3 clone A31 **

** American Type Culture Collection cell lines.*

4.1.2 TERRENI DI COLTURA E REAGENTI / CULTURE MEDIA AND REAGENTS

4.1.2.1 Terreno di coltura delle colture cellulari / Culture medium

Minimum Essential Medium (DMEM) (BioWithaker Europe) addizionate con il 10% di siero fetale bovino (SFB), l'1% di L - glutammina e l'1% di penicillina - streptomicina (pen - strep). / *Minimum Essential Medium (MEM-BioWithaker Europe) supplemented with appropriate concentration of inactivated and mycoplasma-free foetal calf serum (FCS) 10%, L - glutaminy 1% and antibiotics penicillin - streptomycin (pen - strep) 1%.*

4.1.2.2 Soluzioni per colture cellulari / Phosphate Buffered Saline for cell cultures:

Soluzione PBS salina Tris-buffer (TBS) (25 mM Tris): si sciolgono 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 3 g di Tris base in 800 ml di H₂O distillata. Si porta a pH 7,4 ± 0,2 aggiungendo HCl. Si aggiunge H₂O distillata fino ad 1 litro. La soluzione viene suddivisa in aliquote e sterilizzata in autoclave a 121°C per 20 - 30 min. La soluzione deve essere conservata a temperatura ambiente. /

The Phosphate Buffered Saline PBS is Tris-buffer (TBS) (25 mM Tris): dissolve 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris in water and dilute to 1000 ml. After adjustment, the pH of the solution shall be 7,4 ± 0,2 before use. The PBS is kept in small volumes and sterilise by autoclave at 121°C for 20 - 30 min. The solution shall be stored at room temperature for a maximum holding time of one month.

4.1.2.3 Soluzione di Tripsina - Versene per la disgregazione delle cellule /

Trypsin-Versene (EDTA [ethylenediaminetetraacetic acid]):

Tripsina/Trypsin	2,5 g
Versene (EDTA)	1,00g

The Trypsin-Versene is kept in small volumes (4 ml) below - 20°C.

4.2

**APPARECCHIATURE /
MICROBIOLOGICAL LABORATORY EQUIPMENT**

1. Autoclave a vapore in grado di sterilizzare alla temperatura di 121°C a 1 atm per 15 minuti / *Apparatus for sterilisation for moist heat sterilisation an autoclave at 121°C for 15 min;*
2. Microscopio invertito per l'osservazione delle colture cellulari. / *Inverted microscope for reading cell culture microscopically.*
3. Cronometro. / *Stopwatch.*
4. Piaccametro. / *pH-meter, having an accuracy of calibration of 0,1 pH units at 25°C.*
5. Agitatore Vortex. / *Electromechanical agitator: Vortex mixer.*
6. Centrifuga. / *Centrifuge.*
7. Incubatore CO₂ (5%) in grado di mantenere la temperatura a 36°C ± 1°C. / *CO₂ incubator (95% air, 5% CO₂), capable of being controlled at 36°C ± 1°C, for incubation of cell cultures.*
8. Fabbricatore ghiaccio per conservare le cellule sospese durante il test. / *Ice producing machine to cool the cell maintenance medium and the reaction mixtures during the test.*
9. Agitatore a bascula. / *Mechanical shaker.*
10. Cappa a flusso laminare verticale "BioHazard" classe II. / *Biological safety cabinet with Air Clean Systems Vertical Laminar Flow - "Biohazard" class II.*
11. Bagnomaria termostata. / *Water bath capable of being controlled at 20°C±1°C.*
12. Frigorifero a 2°C ± 8°C / *Refrigerator at 2°C±8°C, Congelatore a -70°C / Freezer at - 70°C± 1°C.*
13. Lettore di micropiastre MULTISKAN MS PRIMARY EIA / *microtiter plate reader MULTISKAN MS PRIMARY EIA*

5 DETERMINAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ / EVALUATION OF CYTOTOXICITY

5.1

La citotossicità è stata determinata qualitativamente e quantitativamente:

1) **VALUTAZIONE QUALITATIVA** consiste nell'esaminare le cellule al microscopio, utilizzando un colorante citochimico / vitale per osservare le eventuali alterazioni, quali morfologia, vacuolizzazione, distacco o lisi cellulare e integrità della membrana.

I risultati valutati sono stati interpretati in base alla scala di citotossicità seguente:

0 = Non citotossico

1 = Lievemente citotossico

2 = Moderatamente citotossico

3 = Gravemente citotossico

Cytotoxicity was determined qualitatively and quantitatively:

1) **QUALITY EVALUATION** is to examine the cells under a microscope using a dye cytochemical vital to observe the morphology, the vacuolation, or cell lysis and membrane integrity. The evaluated results were interpreted according to the scale of cytotoxicity following:

0 = Not cytotoxic

1 = Mildly cytotoxic

2 = Moderately cytotoxic

3 = Severely cytotoxic

3 = Not biocompatible; the presence of the irritation and cytotoxic; **NOT ACCEPTABLE.**

5.2

2) **VALUTAZIONE QUANTITATIVA** consiste nel misurare la morte cellulare, l'inibizione della crescita cellulare, la proliferazione delle cellule, il rilascio di enzimi o la riduzione di colorante Vitale (MTT).

TEST MTT è una prova quantitativa colorimetrica che utilizza il colorante vitale MTT [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromuro], il quale è ridotto nei mitocondri cellulari dall'enzima deidrogenasi mitocondriale della catena respiratoria cellulare, nel sale di tetrazolio MTT. All'interno della cellula si formano cristalli di formazano di colore violetto non solubile in acqua, che vengono determinati spettrofotometricamente per ottenere il numero di mitocondri e quindi il numero di cellule viventi nel campione.

2) **QUANTITATIVE EVALUATION** is to evaluate the cell death, inhibition of cell growth, cell proliferation, release of enzymes or reduction of vital dye (MTT). The test MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] based colorimetric assay for measurement of *in vitro* cytotoxicity and cell proliferation.

The numbers of viable cells growing in microplate wells can be read by an automatic microplate scanning spectrophotometer. It's examined the stability of the optical density of dissolved formazan solution by a spectrophotometer.



5.3

ESPRESSIONE DEI RISULTATI/ EXPRESSION OF RESULTS

Il risultato è espresso in tabella come IC₅₀ della formula seguente:

The result is expressed as IC₅₀ of the following formula:

$$\% \text{ inibizione vitalità cellulare} = 1 - \left[\frac{\text{OD}_{570} \text{ Cellule trattate/} \text{ treated cells}}{\text{OD}_{570} \text{ Cellule non trattate/} \text{ untreated cells}} \right] \times 100$$

Cell viability inhibition (%)

OD = densità ottica / optical density

Il valore IC₅₀ indica la concentrazione di prodotto necessaria per inibire la crescita cellulare del 50%. IC₅₀ è un parametro che consente di valutare il potenziale irritante di un composto, come segue:

IC₅₀ < 0,5 indica un forte effetto citotossico/irritante.

IC₅₀ tra 0,5 e 1,5 indica un moderato effetto citotossico/irritante.

IC₅₀ > 1,5 indica assenza di qualsiasi effetto citotossico/irritante.

The IC₅₀ value, shown in table, indicates the concentration of product required to inhibit cell growth by 50%.

IC₅₀ is a parameter for assessing the irritation potential of a compound, in the following:

IC₅₀ < 0.5 indicates a strong cytotoxic / irritating effect.

IC₅₀ between 0.5 and 1.5 indicates a moderate cytotoxic / irritating effect.

IC₅₀ > 1.5 indicates the absence of cytotoxic / irritating.

5.4 **METODO: PROVA PER CONTATTO DIRETTO /
TEST METHOD FOR CONTACT**

5.4.1 **PREPARAZIONE DELLA COLTURA CELLULARE/
PREPARATION OF CELL CULTURE**

Ogni linea cellulare è stata seminata in piastre da 96 pozzetti alla densità di 5×10^5 cell/well e incubate fino al raggiungimento dell'80% della confluenza.

Each cell line was seeded in 96 well plates at a density of 5×10^5 cell / well and incubated up to 80% confluence.

5.4.2 **PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DISPOSITIVO MEDICO PER LA PROVA A
CONTATTO DIRETTO:**

Il prodotto è stato sottoposto a taglio e sottoposto a trattamento con PBS (Phosphate buffered saline): ogni provino di dimensioni di 1 cmx1cm di lato di **PLC RESINA (ADVIAIR SRL)** è stato posto in 5 ml per 24 ore e poi posto a diretto contatto con il monostrato cellulare.

I provini (12 provini) sono stati posti a contatto con le cellule ad incubare con il 5% di CO₂ alla temperatura di $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 48 ore. Al termine del tempo di esposizione ogni pozzetto è stato sottoposto a un lavaggio con PBS (Phosphate Buffered Saline), sono stati aggiunti 200 µl del terreno-MTT e dopo incubazione con il 5% di CO₂ alla temperatura di $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 4 h, è stato aspirato il terreno-MTT e sono stati aggiunti 200 µl di soluzione solubilizzante MTT (10% Triton X-100 plus 0.1 N Hcl in anhydrous isopropanol).

Dopo 30 minuti, in agitatore a bascula a 37°C , per dissolvere tutti i cristalli di formazano e ottenere una soluzione omogenea.

Allo spettrofotometro è stato effettuata la lettura dell'assorbanza a 570 nm.

MEDICAL DEVICE SAMPLE PREPARATION FOR TESTING A DIRECT CONTACT

*The product was subjected to cutting and subjected to treatment with PBS (Phosphate buffered saline): each specimen of dimensions of 1 cmx1cm side of **PCL RESIN (ADVIAIR SRL)** was placed in 5 ml for 24 hours and then placed in direct contact with the cell monolayer.*

Each specimen of the Gel - PIC (12 specimens) was in contact with the cells incubated with 5% CO₂ at a temperature of $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 hours. After the contact time each well was washed with PBS and add 200 µl media -MTT and incubate at $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with 5% CO₂ at for 4 h.

After aspiration of medium-MTT was added 200 µl solution with 10% Triton X-100 plus 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol.

After 30 minutes at 37°C to dissolve all the crystals of formazan and obtain a homogeneous solution was done reading the absorbance value at spectrophotometer at 570 nm.

6-RISULTATI/RESULTS:**6.1 – RISULTATI / RESULTS: Valutazione qualitativa:**

Risultati a diretto contatto con cellule Vero e Balb 3T3 /
Results evaluation qualitative VERO and Balb 3T3 cell

Concentrazione <i>/concentration mg/ml</i>	Osservazione M.O. / <i>Observation M.O.</i>	Valore/ <i>Value</i>	Interpretazione del risultato/ <i>Interpretation of results</i>
PCL RESINA (ADVIHAIR SRL)			
Controllo positivo/ <i>Positive control:</i> SDS 0.06 mg/ml	alterazione del monostrato cellulare; distacco cellulare presenza cellule morte <i>alteration of the cell monolayer:</i> <i>cellular detachment presence cell</i> <i>death</i>	3,0	Gravemente citotossico/ <i>Severely cytotoxic</i>
Controllo negativo <i>/Negative control:</i> D- NEM	Nessuna alterazione / <i>no alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
Culture cellulare / <i>cell culture</i>	Nessuna alterazione / <i>no alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P1-P4 1 cm ² / well	Nessuna alterazione / <i>no alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P5-P8 1 cm ² / well	Nessuna alterazione / <i>no alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P9-P12 1 cm ² / well	Lieve alterazione / <i>Light alteration in cell</i>	0	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>

P=provino / *specimen*

ESITO:

Per il campione dispositivo medico PCL RESINA in esame posto a diretto contatto con le cellule "in vitro", non è stato osservato nessuna alterazione cellulare e quindi nessuna evidente reazione di irritazione cellulare: il risultato ottenuto è ACCETTABILE.

RESULT:

The test medical device examined by direct contact with the cells "in vitro", was not observed any cellular alteration, any significative reaction of cellular irritation: the result obtained is ACCEPTABLE.

6.2-RISULTATI/RESULTS: TEST MTT Cellule Vero / VERO cells (= fibroblasts)**TABELLA 1 / TABLE 1:**Risultati della % di inibizione della vitalità cellulare / *Cell viability inhibition (%)*Spettrofotometro: *MULTISKAN MS PRIMARY EIA*

Concentrazione <i>/concentration mg/ml</i>	% inibizione della vitalità cellulare / <i>Cell viability inhibition (%)</i> Valori medi / <i>Mean</i>	IC ₅₀	RISULTATO / <i>RESULT</i> MTT TEST
Controllo positivo/ <i>Positive control: SDS 0.06 mg/ml</i>	0.405 0.410 0.402	< 0,5	Citotossico / <i>Cytotoxic</i>
Controllo negativo <i>Negative control: D-MEM</i>	2.250 2.245 2.230	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
Culture cellulare / <i>cell culture</i>	-	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P1_P2 1 cm ² / well	1.650 1.605 1.640	>1,5	Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P3_P4 1 cm ² / well	1.590 1.600 1.650		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P5_P6 1 cm ² / well	1.670 1.700 1.730		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P7_P8 1 cm ² / well	1.600 1.595 1.590		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P9_P10 1 cm ² / well	1.680 1.650 1.640		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>
P11_P12 1 cm ² / well	1.630 1.600 1.600		Non Citotossico / <i>Not Cytotoxic</i>

ESITO:

Il campione dispositivo medico PCL RESINA (ADVIHAIR) in esame posto a diretto contatto con le cellule "in vitro", si presenta NON CITOTOSSICO "in vitro", in quanto non è stato osservato nessuna percentuale di inibizione cellulare dei fibroblasti Vero e quindi il risultato ottenuto è ACCETTABILE.

RESULT:

The test medical device examined by direct contact with the cells "in vitro", was not observed any cell viability inhibition of the CCL-81 (Vero) fibroblasts: the result obtained is ACCEPTABLE.

6.3-RISULTATI/RESULTS: TEST MTT Cellule Balb 3T3 / Balb 3T3 cell

TABELLA 1 / TABLE 1:

Risultati della % di inibizione della vitalità cellulare / Cell viability inhibition (%)

Spettrofotometro: MULTISKAN MS PRIMARY EIA

Concentrazione /concentration mg/ml PCL RESINA (ADVIHAIR SRL)	% inibizione della vitalità cellulare / Cell viability inhibition (%) Valori medi / Mean	IC ₅₀	RISULTATO / RESULT MTT TEST
Controllo positivo/ Positive control: SDS 0.06 mg/ml	0.445 0.450 0.450	< 0,5	Citotossico / Cytotoxic
Controllo negativo Negative control: D-MEM	2.290 2.200 2.245	>1,5	Non Citotossico / Not Cytotoxic
Culture cellulare / cell culture	-	>1,5	Non Citotossico / Not Cytotoxic
P1_P2 1 cm ² / well	1.760 1.700 1.680	>1,5	Non Citotossico / Not Cytotoxic
P3_P4 1 cm ² / well	1.610 1.600 1.630		Non Citotossico / Not Cytotoxic
P5_P6 1 cm ² / well	1.650 1.600 1.650		Non Citotossico / Not Cytotoxic
P7_P8 1 cm ² / well	1.600 1.600 1.710		Non Citotossico / Not Cytotoxic
P9_P10 1 cm ² / well	1.650 1.640 1.620		Non Citotossico / Not Cytotoxic
P11_P12 1 cm ² / well	1.610 1.600 1.620		Non Citotossico / Not Cytotoxic

ESITO:

Il campione dispositivo medico PCL RESINA (ADVIHAIR) in esame posto a diretto contatto con le cellule "in vitro", si presenta NON CITOTOSSICO "in vitro", in quanto non è stato osservato nessuna percentuale di inibizione cellulare dei Balb/3T3 clone A31 e quindi il risultato ottenuto è ACCETTABILE.

RESULT:

The test medical device examined by direct contact with the cells "in vitro", was not observed any cell viability inhibition of the Balb/3T3 clone A31: the result obtained is ACCEPTABLE.

7 – CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

In base ai risultati ottenuti, il prodotto DISPOSITIVO MEDICO in esame denominato /
According to the obtained results, the test MEDICAL DEVICE product called

ADVIHAIR S.R.L.

PCL RESINA (adesivo per epitesi capillari)

risulta "in vitro" NON CITOTOSSICO e non ha presentato effetti irritanti su colture cellulari,
secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 10993-5:2009. /

*according to UNI EN ISO 10993-5:2009 the product were found be NOT CYTOTOXIC:
not presented a irritant effects "in vitro" in cell cultures.*

Data report: 20/06/2013 / Date: June 20th 2013
Revisione 1: 15/07/2013
Revisione 2: 08/08/2013

Pier Giorgio Balboni

(Responsabile scientifico Firma / Signature
Prof. Pier Giorgio Balboni)
UNIVERSITY OF FERRARA DPT. MEDICINE
Prof. cultore della materia "Microbiologia"