

MedSpace

Scientific Review



Suppl. MedSpace X, vol. IV-III : 1-11, Novembre 2011

Verifica dell'attività lenitiva di un unguento di Glicerofosfoinositolo e di estratto di Perilla: un'azione sinergica antinfiammatoria, lenitiva, protettiva nel trattamento coadiuvante della dermatite atopica

a cura di Mauro Barbareschi, Leonardo Celleno, Stefano Veraldi

GLICEROFOSFOINOSITOLO ESTRATTO DI PERILLA

Il glicerofosfoinositolo (GPI) è un precursore della sintesi dei fosfolipidi delle membrane cellulari. Alcuni studi hanno concluso che il GPI non presenta effetto citotossico, mentre possiede un'azione anti-infiammatoria correlata a una riduzione della liberazione dell'IL-1 α . Test condotti su volontari sani hanno confermato che GPI non ha effetti fotosensibilizzanti ed è in grado di indurre un effetto inibitorio nei confronti dell'eritema. La perilla è una pianta ricca in acidi grassi, in particolare omega-3. I principi che si estraggono dalle foglie sono utilizzati per la loro attività anti-infiammatoria, anti-allergica e anti-batterica.

Queste sostanze favoriscono la corretta strutturazione delle membrane, la sintesi delle ceramidi e la composizione del film lipidico di superficie.

EVIDENZE CLINICHE

Uno studio recente che ha previsto l'utilizzo di un nuovo prodotto cosmetico *Osmín-Top unguento a base di glicerofosfoinositolo ed estratto di perilla* ha evidenziato la sua azione, protettiva sulla cute, e di efficace contrasto nell'infiammazione cronica. I risultati sono dovuti all'azione sinergica dei principi attivi in esso contenuti che, essendo sostanze cosmetiche e non medicinali, presentano il grande vantaggio di non indurre effetti collaterali negativi.

Verifica dell'attività lenitiva di un unguento di Glicerofosfoinositolo e di estratto di Perilla: un'azione sinergica antinfiammatoria, lenitiva, protettiva nel trattamento coadiuvante della dermatite atopica

Mauro Barbareschi, Leonardo Celleno*, Stefano Veraldi

Dipartimento di Anestesiologia, Terapia intensiva e Scienze dermatologiche, Università di Milano, Fondazione I.R.C.C.S., Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

**Professore Associato di Dermatologia - Università Cattolica Roma*

Glicerofosfoinositolo ed estratto di Perilla

Key Words

Glicerofosfoinositolo
Estratto di Perilla
Osmin-Top unguento
Dermatite
IL-1 α
Attività fotoprotettiva
Azione antiossidante
Eritema

Editore

OxysTM publishing - © 2011

Il glicerofosfoinositolo (GPI) è un precursore della sintesi dei fosfolipidi delle membrane cellulari. Il GPI si lega agli acidi grassi, in particolare all'acido arachidonico in posizione 2, generando il fosfatidilinositolo, uno dei principali fosfolipidi di membrana. Questo "sequestro" dell'acido arachidonico — precursore della sintesi di importanti mediatori dell'infiammazione, come i leucotrieni e le prostaglandine — determina un effetto anti-infiammatorio. Il GPI si presenta sotto forma di sale di colina. La colina è un precursore della sintesi della fosfatidilcolina e della sfingomielina, a sua volta precursore della formazione delle ceramidi. La colina presenta quindi un'azione indiretta "ristrutturante" dell'epidermide.

Studi sperimentali sul glicerofosfoinositolo

Il GPI, addizionato a colture di cellule tiroidee e di fibroblasti di topo, attivati con ATP, ha determinato una riduzione tempo- e concentrazione-dipendente della liberazione di acido arachidonico.

Il GPI si è dimostrato attivo anche in vivo, avendo determinato una riduzione dello stravasato di plasma nell'orecchio del topo indotto da agonisti dei recettori delle tachichinine, nonché una riduzione dello spessore della cute dell'orecchio indotta dall'applicazione di esteri del forbolo. Risultati simili sono stati osservati nel ratto, in cui è stato indotto uno stravasato di plasma con la somministrazione di sostanza P.

Dal punto di vista tossicologico, il GPI non provoca effetti tossici acuti dopo somministrazione orale fino a 2 g/kg. La LD50 dopo somministrazione endovenosa è di circa 350 mg/kg.

Valutazione *in vitro* del potenziale irritativo e del potenziale anti-infiammatorio

Il GPI è stato testato sotto forma di soluzione. Come controllo positivo (irritante) è stato utilizzato un tensioattivo, il sodio-lauril-solfato allo 0.5% in polvere. Sono stati effettuati i seguenti studi:

- a. citotossicità, mediante il test MTT: si tratta di un test di sopravvivenza cellulare su epidermide

coltivata in vitro in pluristrato, con uno strato corneo ben differenziato. L'epidermide è stata ottenuta da cheratinociti umani primari, cioè provenienti da cute sana di donatore;

- b. potenziale irritante: è stato studiato il grado di inibizione della liberazione di mediatori dell'infiammazione, in particolare l'IL-1 α , una citochina pro-infiammatoria, la cui sintesi e liberazione può essere indotta da vari stimoli esogeni, tra cui i tensioattivi, come il sodio-lauril-solfato.

Dopo esposizione dell'epidermide per 16 ore al sodio-lauril-solfato, è stato registrato circa il 6% di cheratinociti vitali, quindi con una mortalità cellulare del 94%. Al contrario, il GPI non ha mostrato effetti citotossici: è stato infatti osservato un significativo incremento della vitalità cellulare (oltre il 110%).

L'esposizione dell'epidermide al sodio-lauril-solfato causa la liberazione di IL-1 α , sia dopo due sia dopo sei ore dall'esposizione, fino a un massimo di 35 pg/ml di IL-1/medium di coltura dell'epidermide. L'aggiunta di GPI riduce significativamente i livelli di IL-1 α sia dopo due ore (livelli non determinabili) sia dopo sei ore (6.9 pg/ml) dall'esposizione al sodio-lauril-solfato. Il GPI da solo non causa la liberazione di IL-1 α .

In base ai risultati di questi studi, il GPI non presenta un effetto citotossico; presenta, inoltre, un effetto protettivo, quindi anti-infiammatorio, nei confronti della liberazione di una citochina pro-infiammatoria come l'IL-1 α .

Valutazione del potere sensibilizzante cutaneo mediante local lymph node assay (LLNA)

Il prodotto, sotto forma di soluzione come tale o diluita al 25-50% in dimetilformammide, è stato testato su animali appartenenti al ceppo murino CBA/Ca (CBA/CaBkl) mediante applicazione topica (25 μ l/die sulla superficie dorsale di ciascun orecchio per

tre giorni consecutivi). Il controllo negativo era costituito da un gruppo di quattro animali, trattati con la sola dimetilformammide, secondo le stesse modalità. Cinque giorni dopo la prima applicazione, sono stati somministrati 250 μ l di una soluzione tampone fosfato contenente 3H-metil-timidina. Cinque ore dopo la somministrazione dell'isotopo radioattivo, gli animali sono stati sacrificati mediante asfissia con anidride carbonica. Sono stati quindi asportati i linfonodi auricolari. In base ai risultati di questo test, il prodotto non ha mostrato un'attività sensibilizzante.

Valutazione del potere fotosensibilizzante in volontari sani

Sono stati arruolati volontari sani di entrambi i sessi e di età superiore a 18 anni.

Patch con GPI sono stati applicati sull'avambraccio e sono stati rimossi dopo 24 ore; l'area è stata quindi esposta per 4.54 minuti a 5 joules/cm² di UVA: questo dosaggio è ritenuto sufficiente per scatenare una risposta fotoallergizzante. La lettura è stata effettuata dopo 30 minuti, 24 e 48 ore dall'irradiazione. Sono stati considerati valutabili 13 volontari (2 maschi e 11 femmine, di età compresa tra 28 e 58 anni). I fotopatch test sono risultati negativi in tutti i soggetti.

Valutazione dell'attività fotoprotettiva e lenitiva nei confronti dell'eritema da UVB in volontari sani

A dodici volontari sani con fototipo II e III è stato indotto un eritema sull'avambraccio mediante una lampada ultravioletta in grado di emettere radiazioni nell'intervallo 290-320 nm, con un picco a 302 nm. In base ai risultati di questo test, i prodotti testati, e in particolare una formulazione allo 0.25% veicolata da liposomi, hanno dimostrato un elevato effetto inibitorio nei confronti dell'eritema indotto dalle radiazioni UVB.

Questi studi hanno dimostrato che il GPI non è irritante, nè allergizzante né fotosensibilizzante: presenta, al contrario, un'azione anti-infiammatoria e fotoprotettiva.

In commercio sono disponibili un unguento e una crema che uniscono diversi attivi: ceramidi, acidi grassi polinsaturi, fitosteroli e perilla, GPI sotto forma di sale di colina.

Ceramidi

Le ceramidi sono un gruppo di sostanze di natura lipidica presenti per il 50% nei lipidi epidermici dello strato corneo. Svolgono il ruolo principale di legare le cellule dello strato corneo le une alle altre e di regolare in questo modo il flusso trans-epidermico di acqua. Vengono liberate negli spazi intercorneocitari dopo la fusione alla membrana cellulare dei cheratinosomi dello strato granuloso. All'interno di tali spazi si dispongono in regolari strati tri-laminari.

Questa unità lipidica ha come scheletro la sfingosina a cui è legato con legame amidico un acido grasso a lunga catena ramificata.

Sfingosina + ac.grasso = ceramide

Glicosilceramide ha un radicale saccaridico legato all'ossidrilica della sfingosina

Ceramide + fosfato + colina = sfingomielina

Ceramide + carboidrati = cerebrosidi o glicofosfolipidi

Le ceramidi fungono inoltre da "collante" dei corneociti.

Le ceramidi stringono stretto rapporto con acidi grassi essenziali (EFA).

I principali acidi grassi polinsaturi a lunga catena appartengono alla serie omega 3 (ac.alfa linolenico) e alla serie omega 6 (ac. linoleico e gamma linolenico).

In letteratura è ampiamente dimostrato che in pazienti affetti da dermatite atopica l'acido linoleico e l'acido alfa linolenico sono sistematicamente carenti

ed il loro apporto esogeno aiuta a migliorare i sintomi della malattia.

Essi sono necessari per la corretta struttura delle membrane cellulari e del film idro-acido-lipidico di superficie. Gli EFA coniugandosi ad un aminoalcol, la sfingosina, formano le ceramidi.

Essi dopo una serie di reazioni ossidative si trasformano in eicosanoidi (ac. grassi a 20 atomi di carbonio) prostaglandine (PG), trombossani (TX) e leucotrieni (LT) che sono i mediatori chimici dell'infiammazione.

Fitosteroli

I fitosteroli e i suoi glicosidi sono molecole di natura sterolica, strutturalmente correlate al colesterolo.

Le molecole più importanti sono il beta-sitosterolo, il campesterolo, e lo stigmasterolo. Il notevole interesse nell'ambito scientifico, rivolto ai fitosteroli è evidenziato dai numerosi studi farmacologici ed epidemiologici pubblicati nell'ultimo decennio, che attribuiscono a questa serie di composti importanti proprietà terapeutiche.

I fitosteroli sono molecole sintetizzate nelle piante, e l'uomo le può assumere soltanto attraverso una dieta ricca di frutta e verdura. A questo scopo l'assunzione di quantità consistenti, è possibile attraverso derivati ottenuti dall'olio di palma o dall'olio di soia. L'olio di palma è uno dei più importanti oli edibili per uso nutraceutico, dal quale si ottengono tutta una serie di estratti contenenti importanti nutrienti, per applicazioni preventive e terapeutiche.

I fitosteroli in cosmesi trovano notevole riscontro in quanto possiedono ottime proprietà idratanti, dermofile ed emollienti. Effetti benefici per la pelle, possono derivare anche dalla integrazione alimentare. Infatti è stato dimostrato che i fitosteroli assunti con la dieta, vengono accumulati anche nella pelle, attraverso il passaggio dal sangue a questo tessuto,

andando ad integrarsi con i lipidi epidermici.

L'impiego cosmetico dei fitosteroli è anche considerato dal punto di vista tecnologico, in quanto possono essere impiegati sia come modificatore reologico, che stabilizzante di emulsioni. Per uso topico i test di irritazione cutanea primaria, escludono alcuna potenzialità irritante, e ne garantiscono la sicurezza d'impiego.

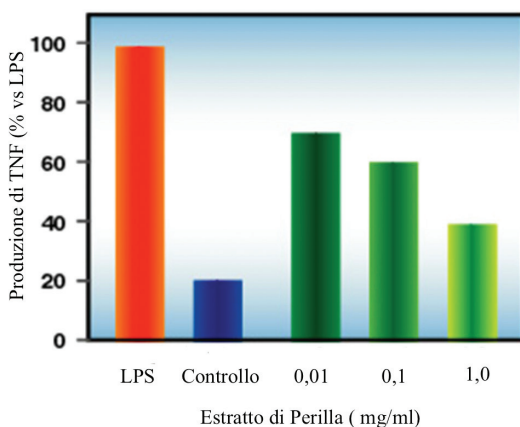
Estratto di Perilla

La perilla (famiglia delle *Labiatae*) è una pianta dalle foglie verdi che cresce in India, in Cina e in Giappone. È una pianta edibile che possiede attività detossificanti, anti-tussive, antibiotiche e antipiretiche. È utilizzata nella medicina tradizionale cinese per trattare disturbi intestinali ed allergici.

Dalle foglie si estraggono principi che possono essere utilizzati per la loro attività anti-infiammatoria, anti-allergica e anti-batterica:

- l'azione anti-infiammatoria è dovuta alla inibizione del TNF α (Figura 1)
- l'azione anti-allergica alla inibizione della sintesi delle IgE (Figura 2)
- l'azione anti-batterica è stata dimostrata su ceppi di *Staphylococcus aureus*.

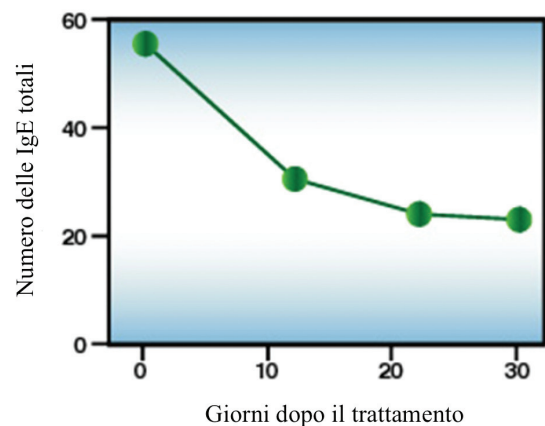
Figura 1 - Effetti inibitori dell'estratto di Perilla sulla produzione di TNF-alfa da parte dei macrofagi



L'estratto di perilla ha dimostrato di possedere un'azione anti-ossidante. Ciò è stato possibile utilizzando leucociti neutrofili stimolati da *Escherichia coli*. Dopo l'aggiunta dell'estratto, la sintesi di radicali liberi è diminuita in modo statisticamente significativo.

L'estratto è stato impiegato per la cura dell'acne e di altre dermatiti. L'estratto appare trasparente e di colore simile alla ruggine ed è ricco in acido linoleico, α -linolenico (omega 6, omega 3), isoflavoni, come apigenina, luteina e acido rosmarinico, antociani e terpenoidi. L'acido α -linolenico, una volta sulla pelle è convertito in acido eicosapentaenonico (EPA), a sua volta precursore delle prostaglandine e dei trombossani.

Figura 2 - Effetti inibitori dell'estratto di Perilla sulla produzione di IgE



La presenza degli EFA favorisce la corretta strutturazione delle membrane cellulari, la sintesi delle ceramidi e la composizione del film idro-lipidico di superficie. Inoltre, gli EFA sono i precursori di prostaglandine e leucotrieni.

Gli antociani hanno attività vasoprotettive e anti-infiammatorie, mantengono la normale permeabilità vascolare, sono antiossidanti e anti-radicali.

I terpenoidi hanno proprietà antibatteriche e antiossidanti

Applicato sulla cute alla stregua di un patch test, l'e-

stratto non dà luogo a reazioni avverse. Vi sono dati che mettono in risalto come, alla concentrazione del 3%, l'applicazione su 30 volontari affetti da dermatite atopica, 2/3 volte al giorno per 8 settimane, ha prodotto effetti clinici simil-steroidi. Il 40% dei pazienti è migliorato in modo molto evidente, il 26.7% dei pazienti in modo evidente, il 16.7% in modo lieve. Il 16.7% dei pazienti non ha mostrato miglioramenti mentre il 3.3% è peggiorato.

L'applicazione dell'estratto di perilla su una cute con alterazioni della funzione barriera determina una protezione dall'eritema indotto fino a due ore dal danno, svolgendo quindi un'azione lenitiva, con aumento dell'idratazione cutanea e riduzione della trans-epidermal water loss.

Il 2,4 dinitrofluorobenzene (DNFB) è stato utilizzato in un modello animale per provocare una dermatite atopica sperimentale. Dopo aver provocato la dermatite a livello dell'orecchio, sono stati contati gli eosinofili, le cellule dell'immunità, l'espressione delle metalloproteinasi (MMP) 9, dell'IL-31 e di un fattore di trascrizione (T-bet). Il risultato ha dimostrato una drastica diminuzione della dermatite, con riduzione della risposta immune e del numero totale degli eosinofili tissutali.

Evidenze cliniche

L'infiammazione cutanea caratterizza e sostiene la dermatite atopica rappresentando lo stimolo che per primo promuove il circolo vizioso che mantiene la dermatosi. Se si vuole interrompere la sequela di eventi che contraddistinguono la dermatite atopica è necessario intervenire, sui vari momenti patogenetici della DA. ma è essenziale agire sulla cronica infiammazione che fa da sfondo e accompagna la sintomatologia clinica della malattia.

Sebbene numerosi farmaci steroidei topici siano disponibili per contrastare i fenomeni infiammatori,

l'uso reiterato dei cortisonici non è consigliabile.

Diventa allora importante poter disporre di un prodotto che consenta un trattamento coadiuvante lenitivo quotidiano che sia di per sé scevro dagli effetti collaterali indotti dai cortisonici ma che al contempo sia davvero efficace nel ridurre l'infiammazione presente.

Per valutare l'efficacia anti-infiammatoria di un prodotto, accanto alle consuete osservazioni cliniche, si può ricorrere a test sperimentali quali quelli che prevedono l'induzione controllata di un'infiammazione e la valutazione della riduzione dell'eritema indotto tramite l'applicazione di un prodotto.

Nel caso di Osmin Top si è ricorsi al test di "Verifica dell'attività lenitiva di un prodotto cosmetico" condotto dal laboratorio "Evic -Italia".

Riportiamo brevemente sia il protocollo di esecuzione del test che le sue conclusioni.

Obiettivo del test

E' stato eseguito uno studio il cui scopo è stato quello di verificare l'attività lenitiva di un prodotto cosmetico Osmin-Top unguento.

Criterio di inclusione

Sono stati reclutati 10 pazienti volontari di entrambi i sessi di età compresa tra i 18 ed i 60 anni e fototipo (Fitzpatrick): da I a III

Metodi

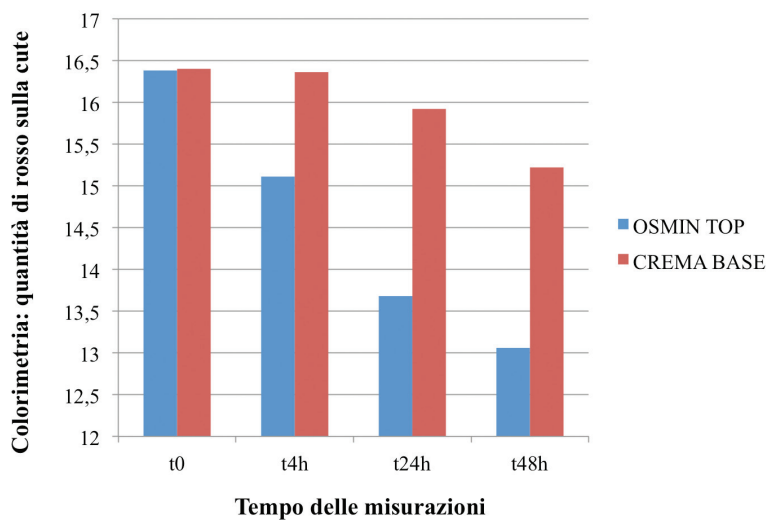
Lo studio è stato condotto nel mese di Ottobre 2011. Sull'avambraccio di ciascun volontario sono state selezionate 3 aree cutanee adiacenti:

- Zona A
- Zona B
- Zona C

Le 3 aree sono state sottoposte ad irradiazione UVA+B per un tempo sufficiente ad indurre un eritema di grado moderato (2 MED).

24 ore dopo l'irradiazione, sulle 3 zone è stata condotta la misurazione strumentale di colorimetria per la valutazione del rossore cutaneo.

Figura 3 - Valori medi ottenuti ai diversi tempi sperimentali



Immediatamente dopo, su 2 delle 3 aree cutanee è stata applicata con metodica semi-occlusiva una quantità standard di prodotto in esame e di un prodotto di controllo (Crema base *) come segue:

- Zona A: Osmín-Top unguento
- Zona B: Crema base

La zona C non è stata trattata ed è stata utilizzata come area di controllo.

(*) è stata utilizzata una "crema base" stata scelta fra i prodotti di questo tipo più diffusi

Dopo 4, 24 e 48 ore dall'applicazione dei prodotti, sulle 3 aree cutanee è stata nuovamente condotta la misurazione strumentale di colorimetria.

Valori medi ottenuti ai diversi tempi sperimentali

	Colorimetria (a: quantità di rosso della cute)			
	t0 prima dell'applicazione	t4h 4 ore dopo l'applicazione	t24h 24 ore dopo l'applicazione	t48h 48 ore dopo l'applicazione
Osmin-Top unguento	16,38	15,11	13,68	13,06
Crema base	16,40	16,36	15,92	15,22
Area non trattata	16,32	16,29	15,86	15,11

Variazioni percentuali rispetto al valore basale (t0)

	Colorimetria (a: quantità di rosso della cute)		
	t4h vs t0	t24h vs t0	t48h vs t0
Osmin-Top unguento	-7,75%	-16,48%	-20,27%
Crema base	-0,24%	-2,93%	-7,20%
Area non trattata	-0,18%	-2,82%	-7,41%

Conclusioni

Secondo le condizioni sperimentali adottate in questo studio e considerando la normale regressione dell'irritazione cutanea riscontrata sull'area non trattata e sull'area trattata con il prodotto di controllo, il prodotto Osmín-Top unguento ha dimostrato una buona attività lenitiva.

I risultati ottenuti nel corso dello studio hanno infatti messo in evidenza una riduzione dell'irritazione cutanea più evidente nell'area trattata con il prodotto Osmín-Top unguento sia rispetto all'area trattata con la crema base che rispetto all'area non trattata.

Per una corretta interpretazione dei risultati ottenuti dalla tecnica di colorimetria, va ricordato come l'eritema indotto tramite esposizione agli UV sia di grado lieve - moderato e tenda spontaneamente a regredire dopo le 24-48 ore. Infatti in questa metodica si induce, in volontari sani consenzienti, tramite esposizione al fotostimolatore, un eritema sì ben percettibile, ma certamente si evita di indurre eritemi gravi per tutelare l'integrità della cute dei volontari. Pertanto la regressione dell'eritema, che inizia già a 24 ore dopo la sua induzione, avviene anche nelle zone non trattate o dove è stato posto un prodotto privo di una vera azione lenitiva.

Sono dunque le differenze di regressione dell'eritema tra le zone trattate con un prodotto lenitivo e quelle di controllo (zona non trattata e zona trattata con prodotto di riferimento) che testimoniano del potere anti-infiammatorio del prodotto denominato lenitivo.

Nel caso del prodotto studiato nel test condotto dal laboratorio Evic Italia, i valori colorimetrici riscontrati testimoniano una buona attività lenitiva del prodotto studiato. Infatti, se per semplicità, poniamo attenzione direttamente alle percentuali di regressione dell'eritema riscontrate nelle varie aree in cui è stato indotto l'eritema, l'area trattata con il prodotto Osmin-Top, mostra delle significative inconfutabili differenze rispetto sia alla zona non trattata che nei confronti di quella trattata con la crema base.

Questo test condotto in laboratorio, pur non sostituendosi ai comuni studi clinici, nei quali si valuta l'efficacia globale di un prodotto durante il suo impiego in condizioni cliniche specifiche, è una sicura prova per valutare l'attività lenitiva di un prodotto.

Tra i suoi vantaggi, indubbiamente al primo posto, vanno sottolineate le condizioni sperimentali controllate che eliminano le tante variabili presenti negli studi clinici. Parimenti non trascurabile è la sua

brevità che permette in sole 48 di verificare la reale efficacia lenitiva del prodotto.

Un test, dunque, attendibile e significativo, forse anche più affidabile dello studio clinico per una valutazione precisa del potere lenitivo.

Relativamente al prodotto in studio, non dobbiamo trascurare che tali risultati sono stati ottenuti con un prodotto cosmetico, cioè formulato non con steroidi, ma con principi attivi ammessi per uso cosmetico e non con sostanze medicinali. Questo non significa che le sostanze cosmetiche non svolgano attività farmacologiche, così come è dimostrato anche dai risultati ottenuti in questo caso. Dobbiamo infatti distinguere fra medicinali, prodotti cioè con finalità terapeutiche e prodotti cosmetici, atti a mantenere il buono stato della cute. Tale finalità, è ovvio, non può essere raggiunta se non dall'interazione farmacologica delle sostanze cosmetiche con i processi e i meccanismi che presiedono al mantenimento del corretto funzionamento della fisiologia cutanea. Il grande vantaggio inoltre che ci viene offerto dai prodotti cosmetici è l'assenza di effetti collaterali negativi. Tutto questo è molto importante soprattutto quando dobbiamo confrontarci con l'atopia, una patologia in cui è necessario un trattamento quotidiano in grado di proteggere la cute e di contrastare efficacemente la cronica infiammazione che innesca e mantiene gran parte delle alterazioni cutanee presenti, senza indurre effetti collaterali negativi.

Bibliografia essenziale

Barbareschi M: L'idratazione. In: Barbareschi M, Bettoli V, Fabbrocini G, Innocenzi D, Micali G, Monfrecola G, Tretti Clementoni M, Veraldi S: Principi di dermocosmetologia dell'acne. Milano, 2007; 49-57.

Chardon A, Crétois I, Housseau C: Comparative colorimetric follow-up on humans of the tannings induced by cumulative exposure of UVB, UVA and UVB + A. 16th IFSCC congress, New York, Preprint 1, 1990, 51-70.

Chardon A, Crétois I, Housseau C: Skin colour typology and suntanning pathways. International Journal of Cosmetic science, 1991, 13, 191-208.

Heo JC, Nam DY, Seo MS, Lee SH: Alleviation of atopic dermatitis-related symptoms by *Perilla frutescens* Britton. Int J Mol Med. 2011 Nov;28(5):733-7.

Imaoka K, Inouye S, Takahashi T, Kojima Y: Effects of *Perilla frutescens* extract on anti-DNP IgE antibody production in mice. Arerugi. 1993 Jan;42(1):74-80.

Ishihara T, Okamoto I, Masaki N, Kohno K, Tanimoto T, Ikegami H, Kurimoto M: Inhibition of antigen-specific T helper type 2 responses by *Perilla frutescens* extract. Arerugi. 1999 Apr;48(4):443-50.

Kim DH, Kim YC, Choi UK: Optimization of Antibacterial Activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* Leaf against *Staphylococcus aureus* Using Evolutionary Operation Factorial Design Technique. Int J Mol Sci. 2011;12(4):2395-407.

Muizzidin N, Marrenus K, Maes D, Smith W: Use of chromameter in assessing the efficacy of anti-irritants and tanning accelerator's. J. Soc Cosmet. Chem. (Nov/Dec 1990), 41, 369-378.

Piérard GE: EEMCO guidance for the assessment of skin colour. Jour Europ Acad of Dermatology and Venerology, 1998, 10, 1-11.

Simoniene G, Jurkstiene V, Jankauskiene K, Gailys V, Kevelaitis E, Venskutonis PR: The influence of common perilla (*Perilla frutescens* (L.) Britton) on non-specific cell-mediated immunity-phagocytosis activity. Medicina. 2005;41(12):1042-7.

Ueda H, Yamazaki M: Inhibition of tumor necrosis factor-alpha production by orally administering a perilla leaf extract. Biosci Biotechnol Biochem. 1997 Aug;61(8):1292-5.

Zekonis G, Zekonis J, Sadzeviciene R, Simoniene G, Kevelaitis E: Effect of *Perilla frutescens* aqueous extract on free radical production by human neutrophil leukocytes. Medicina. 2008;44(9):699-705.

