

5 Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung der drei im Jahr 2002 kommerziell verfügbaren rekonstruierten humanen Epidermismodelle, SkinEthic[®], EpiDerm[™] und EPISKIN[®], für die Bestimmung der perkutanen Absorption *in vitro*. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen einer vom BMBF geförderten Validierungsstudie mit Partnern aus Universitäten, Industrie und der ZEBET. Ziel des Projektes war die Etablierung einer standardisierten Testmethode für die Bestimmung der perkutanen Absorption *in vitro* mittels RHE. Um eine regulatorische Akzeptanz der Methode zu ermöglichen, galt es dem von der OECD geforderten Nachweis einer Vergleichbarkeit der RHE zu den bisher empfohlenen Referenzhäuten und -substanzen zu führen.

Gemäß den Empfehlungen der ECVAM und der OECD zur schrittweisen Validierung von Testverfahren gliederte sich das Projekt in mehrere Abschnitte. In der zu Beginn stehenden Methodenentwicklung wurden unterschiedliche Einflussgrößen auf die Permeation quantifiziert. Nach gelungenem Protokolltransfer wurde das Prüfprotokoll für die Prävalidierung verfeinert, des Weiteren ließen sich erste Aussagen über die Barriereigenschaften der Testhäute sowie über die Intra- und Interlaborvariabilität treffen. Für die abschließende Phase der Validierung erfolgte die Erweiterung des Prüfprotokolls auf insgesamt neun Substanzen, die ein weites physikochemisches Spektrum abdeckten.

In der Validierung konnte durch Parallelversuche in einer höheren Anzahl an beteiligten Laboren die statistische Zuverlässigkeit der Daten verbessert und ein direkter Vergleich der erhobenen Endpunkte vorgenommen werden. Bis auf einzelne Ausnahmen waren die RHE-Modelle permeabler als Human- und Schweinehaut, die ein sehr ähnliches Permeationsprofil aufweisen. Das Ranking der Permeation durch RHE stellte sich im Allgemeinen wie folgt dar: SkinEthic[®] > EPISKIN[®] > EpiDerm[™]. In Hinblick auf Reproduzierbarkeit der Permeationsparameter waren die Unterschiede der Streuungen zwischen den Testhäuten statistisch nicht signifikant, d. h. eine bessere Reproduzierbarkeit der mit den RHE-Modellen erhaltenen Testparameter konnte nicht gesichert werden, auch wenn sich eine Tendenz zur geringeren Streuung zeigte.

Unterschiede zwischen den Laboratorien waren auf Grund des unbalanzierten Versuchsdesigns varianzanalytisch nicht erfassbar. Der Beitrag der Intra- und Interlaborvariabilität zur Gesamtstreuung war im Allgemeinen gleich groß. Der Vergleich der Permeationsdaten von Koffein und Testosteron aus der Prävalidierung mit der Validierung zeigte, dass hohe biologische Streuungen der eingesetzten Häute die Gewinnung reproduzierbarer Daten erschwert. Daher sollte bei einer Routinetestung neuer Substanzen Referenzsubstanzen mitgeführt werden. Dafür bieten sich die OECD-Standardsubstanzen Koffein und Testosteron, nicht aber Benzoessäure an, dessen Permeationsverhalten in den hier mittels HPLC Analytik vorgenommenen Versuchen inhomogen war. Ein Vergleich der Testhäute untereinander zeigte, dass das relative Ranking der Permeation über die drei untersuchten RHE-Modelle und Schweinehaut die Permeation in der humanen Epidermis widerspiegelt. Somit ist bei der Permeation aller untersuchten Häute/Modelle ein ausreichender Zusammenhang gegeben.

Die in dieser Arbeit getesteten RHE-Modelle sind somit prinzipiell für die Bestimmung der perkutanen Absorption *in vitro* als Alternative zu Human- und Schweinehaut geeignet. Die abschließenden Versuche mit Koffein und Testosteron unterstreichen, dass mit RHE anhand des generierten Versuchsprotokoll Finite-dose-Untersuchungen möglich sind. Die Testung an RHE wird daher den Anforderungen der Toxikologie gerecht. Die Ergebnisse zeigen zudem eindrücklich die Bedeutung einer hohen Standardisierung bei der Durchführung von Permeationsexperimenten. Die Prüfung zukünftiger RHE-Modelle ist auf Grundlage des entwickelten Protokolls möglich. Die Daten, die erhalten wurden, erlauben zwar die Erstellung eines Prädiktionsmodells zur quantitativen Vorhersage der perkutanen Absorption bisher noch nicht, doch sind die Voraussetzungen für die Erstellung der benötigten Datenbasis geschaffen worden.

5.2 Summary

Within this dissertation three RHE-models, SkinEthic[®], EpiDerm[™] and EPISKIN[®], commercially available in 2002, were characterised for the assessment of percutaneous absorption *in vitro*. The studies have been conducted in the context of a validation study funded by the German Ministry of Education and Research (BMBF) with partners from academia, industry and the ZEBET. The aim of the project was to establish a standardised test approach for assessment of percutaneous absorption *in vitro* based on RHE. In order to make a regulatory acceptance of the method by the OECD possible, the verification of the comparability of RHE with the previously recommended reference skins and substances was required.

In accordance with the recommendations of the ECVAM and the OECD following a stepwise validation of test methods, the project was divided into several sections. At the beginning development of the method, different influencing variables to the permeation were qualified. After the successful protocol transfer the protocol was refined for prevalidation, furthermore initial information about the barrier properties of the test skins as well as the intra- and inter-laboratory-variance were obtained. For the final validation phase the protocol was extended on a total of nine substances covering a wide physicochemical spectrum.

The statistic reliability of data was advanced by increasing the number of investigations in parallel in the validation and the generated endpoints were directly compared. Except for individual cases RHE-models exceed the permeability of human and pig skin, whose permeation profile was quite similar. In general the permeation through RHE is ranked as follows: SkinEthic[®] > EPISKIN[®] > EpiDerm[™]. In the face of the reproducibility of the data, differences in the variability between the tested skins were not statistically significant, i. e. a better reproducibility of the test parameters of the RHE has not been proven, despite of a tendency towards lower variability of the data. Due to the unbalanced study design, differences between the laboratories were not detectable based on the analysis of the variance. In general the contribution of intra- and interlaboratory variance to the overall variability was in the same

range. Comparing the permeation of caffeine and testosterone obtained in the prevalidation with the validation study, high biological variability of the tested skins complicates the generation of reproducible data. Thus, routine testing of new substances should be performed by testing standard substances in parallel. For these purposes the OECD reference substances caffeine and testosterone are appropriate, however not benzoic acid, whose permeation behaviour in the investigations using HPLC-analytic was inhomogeneous. Comparing the tested skins among themselves, the ranking of the permeation through the three tested RHE-models and pig skin reflects the permeation through human epidermis. Thus, in respect to permeation a sufficient correlation between all tested skins/models is given.

In conclusion, the RHE-models investigated within this dissertation are appropriate as an alternative to human and pig skin for the assessment of percutaneous absorption *in vitro* in principle. The final investigations with caffeine and testosterone underline the feasibility of performing finite-dose-experiments on the basis of the generated protocol with RHE. Testing with RHE conforms to the requirements of toxicology. Moreover, the results show impressively the impact of highly standardisation in conducting investigations for assessing percutaneous absorption. Based on the developed test protocol, testing of further RHE-models in the future will be possible. The generated data are not sufficient for setting up a prediction model for quantitative prediction of percutaneous absorption up to now; however, the foundations for collecting of the required data base are laid.