

5 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

5 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Forderung nach tierversuchsfreien Methoden bei der Sicherheitstestung von Kosmetika, der Risikobewertung von Chemikalien und der Arzneimittelprüfung in Richtlinien der EU aufgenommen. Die alternativen Testmethoden zur Bestimmung der perkutanen Absorption sollen dabei nicht nur den Einsatz von Tieren reduzieren oder ersetzen, sondern auch die Reaktion der humanen Haut *in vivo* besser vorhersagen als es mit tierischer Haut möglich ist. Obwohl frisch exzidierte Humanhaut als bevorzugte Testmatrix betrachtet werden kann, ist ihr Routineeinsatz oft wegen unzuverlässiger und nicht ausreichender Bereitstellung durch chirurgische Abteilungen und die Notwendigkeit der sofortigen Verarbeitung / Kryokonservierung nach der Exzision schwierig. Humane Leichenhaut besitzt zwar eine ebenso gute Barrierefunktion wie frische Haut, die nicht gegebene metabolische Funktion, vor allem aber ethische Bedenken schränken ihre Brauchbarkeit für diese Untersuchungen wesentlich ein.

Daher gewinnen die seit einiger Zeit kommerziell verfügbaren biotechnologisch gewonnenen menschlichen Hautmodelle zunehmend an Bedeutung für die toxikologische Prüfung. Die OECD akzeptiert ihren Einsatz bei der Untersuchung der perkutanen Absorption, sobald der Nachweis erbracht ist, dass die Resorption von Referenzchemikalien an Hautmodellen mit deren Resorption an humaner oder porciner Haut vergleichbar ist. Dazu bedarf es jedoch einer gründlichen Standardisierung und Validierung der Testmethode. Dazu wurden die Hautmodelle zunächst hinsichtlich ihrer Stabilität unter den Bedingungen der Permeationsuntersuchungen näher charakterisiert. So zeigten Viabilitäts- und Integritätsuntersuchungen eine deutliche Toxizität bei rekonstruierter Epidermis und bei primären Keratinozyten in Kultur, die mit unterschiedlichen Defizienzmedien für 6 h behandelt wurden. In beiden Fällen reduzierte der Zusatz von 5 % BSA, welches von der OECD als Rezeptormedienzusatz zur Verbesserung der Löslichkeit von hochlipophilen Substanzen in Versuchen zur perkutanen Absorption empfohlen wird, die Viabilität nochmals. Dies konnte als Ursache für die Inhibierung der Metabolisierung des lipophilen Prednicarbats in rekonstruierter Epidermis und in primären Keratinozyten durch BSA nachgewiesen werden. Mittels durchflusszytometrischer Messungen, Verwendung spezifischer und unspezifischer Caspaseinhibitoren im MTT-Reduktionsassay sowie fluoreszenzmikroskopischer

Detektion apoptotischer Zellkerne nach DAPI-Färbung wurde gezeigt, dass apoptotische Vorgänge zwar zum Teil an der Abnahme der Keratinozytenviabilität beteiligt sind, bei der durch BSA verursachten Toxizität allerdings keine Rolle spielen - bei dem finalen, BSA-bedingten Zelluntergang handelt es sich also um Nekrose. Diese Beobachtungen müssen bei der Auswahl der Rezeptormedien bei perkutanen Absorptionsstudien berücksichtigt werden, bei denen die Bestimmung des Metabolismus der untersuchten Substanz und damit die Viabilität der Matrix von Bedeutung sind. Damit entfällt die Grundlage der OECD-Empfehlung, 5 % BSA bei der Untersuchung der perkutanen Absorption lipophiler Substanzen zum Rezeptormedium zuzusetzen.

Die kutane Biotransformation von Coffein, deren Bedeutung sich aus der topischen Anwendung des Xanthins als Kosmetikabestandteil, vor allem aber seiner exponierten Stellung als OECD-Referenzsubstanz ergibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal an humanem Hautmaterial - nämlich primären Keratinozyten, Fibroblasten sowie einem Epidermis- und einem Vollhautmodell - untersucht. Für Coffein und das parallel untersuchte Xanthin Theophyllin konnte eine - aufgrund der Überschneidung der Stoffwechselwege - gemeinsame HPLC-Analytik etabliert werden. Für beide Xanthine zeigte sich stets nur eine geringe Metabolisierung (< 1 %). Hinsichtlich der im Folgenden durchgeführten Permeationsuntersuchungen mit Coffein bedeutete dies, dass eine biotransformationsbedingte Beeinflussung des Penetrations- / Permeationsverhaltens der Substanz damit sicher ausgeschlossen werden konnte. Sowohl qualitativ als auch quantitativ war die Biotransformation beider Xanthine an den Monolayerkulturen mit der an den Hautmodellen ähnlich - es konnte also gezeigt werden, dass die metabolische Kapazität beider Testsysteme vergleichbar ist.

Schließlich wurden in der vorliegenden Arbeit anhand der OECD-Referenzsubstanz Coffein und der Franzzelltechnik unter Berücksichtigung der vorangegangenen Beobachtungen erste wichtige Schritte zur Standardisierung und Validierung der Testmethode zur Bestimmung der perkutanen Absorption vorgenommen. Mehrere, die Permeation möglicherweise beeinflussende Aspekte wurden experimentell untersucht. So erfolgte eine Festlegung auf das statische Versuchsprotokoll, verschiedene Rezeptormedien, inklusive der Zusätze des Lösungsvermittlers Igepal® CA-630 zum Rezeptormedium wurden hinsichtlich der Einflüsse auf Viabilität, Integrität und Permeation geprüft. Igepal® musste wegen hoher Toxizität

ausgeschlossen werden. Als Donormedienzusatz bei der Untersuchung lipophiler Testsubstanzen erschien der Einsatz von Igepal[®] dagegen bis zu einer Konzentration von 2 % tolerabel.

Vergleichende Untersuchungen mit humaner Haut ergaben, dass die *in vitro*-Permeation unabhängig vom Alter des Spenders und der Entnahmeregion (Brust- oder Bauchregion beim Mensch - oder Rücken- oder Abdominalregion beim Schwein) ist. Kryokonservierte Haut zeigte sich ebenso geeignet wie Frischhaut. Dies erleichtert den Routineeinsatz für Permeationsstudien wesentlich. Hitzeseparierte humane Epidermis, die sich hinsichtlich ihrer Permeabilität gegenüber Coffein nicht von humaner Vollhaut unterschied, wurde aufgrund der besser standardisierbaren Präpariertechnik für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Das so entwickelte einheitliche und verbesserte Versuchsprotokoll, das auch Modifikationen in den verwendeten Substanzkonzentrationen und Probenentnahmezeitpunkten beinhaltete, wurde nun in vergleichenden Permeationsuntersuchungen an unterschiedlichen Matrices angewendet. Die relevanten Permeationsparameter konnten eindeutig definiert werden: 'Lag'-Zeiten von weniger als 1 h bei den Hautmodellen ließen beispielsweise eine Verkürzung der Versuchszeiten auf 8 h zu. Wie erwartet ergab der Vergleich der K_p -Werte von Coffein bei Hautmodellen mit denen von porciner oder humaner Haut eine erhöhte Durchlässigkeit der Kunsthäute und eine daraus resultierende Überschätzung der perkutanen Absorption der zu testenden Substanzen. Für eine Aussage über eventuelle Unterschiede in der Variabilität der Permeationsdaten bei den verschiedenen Matrices müssen eine deutliche Erhöhung der Versuchszahl (wie in der Endphase der derzeit im Institut durchgeführten Validierungsstudie geplant) und eine Einbindung weiterer Testsubstanzen erfolgen. Schließlich konnte gezeigt werden, dass weder das MTT-Reduktionsassay noch die histologische Untersuchung im Rahmen von Permeationsuntersuchungen geeignete Qualitätsparameter für die Permeabilität der exponierten Häute sind.

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen demonstrieren die Komplexität von *in vitro*- Permeations- / Metabolisierungsexperimenten, die in Abhängigkeit von ihrem Versuchsprotokoll stark in ihren Ergebnissen variieren können. Eine bessere Abbildung der *in vivo* Situation erscheint möglich. Auch erlauben die Resultate eine bessere Charakterisierung der Hautmodelle hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber

den Bedingungen von Penetrations- / Permeationsuntersuchungen sowie ihrer metabolischen Kapazität. Testbedingungen konnten zudem vereinheitlicht und optimiert werden. Sofern die Charakterisierung und Testung weiterer Modelle und Substanzen eine geringere Variabilität der Penetrations- und Permeationsparameter im Vergleich zu anderen Matrices zeigen sollte, können Humanhautmodelle zukünftig als Testmatrix zur Bestimmung der perkutanen Absorption für die Sicherheitstestung von Chemikalien, z.B. im Rahmen von REACH, von Kosmetika und Arzneimitteln zur Anwendung an der Haut eingesetzt werden.

SUMMARY

In recent years, the demand for alternative test methods in safety assessment of cosmetics, risk assessment of chemicals, and testing of pharmaceuticals was increasingly included in the EU directives. Thereby, alternative test methods for the determination of percutaneous absorption should not only reduce or replace the use of animals but also achieve a more reliable *in vivo* prediction of the response of human skin than animal skin. Even though freshly excised human skin is considered as a preferred test matrix its routine use is often difficult due to undependable and insufficient supply by surgical departments and the necessity of immediate processing / cryopreservation of the skin after excision. Although cadaver skin exhibits a similarly effective barrier function compared to fresh skin, the lacking metabolic capacity and first of all ethic concern restrict its useability for these studies. Thus, in recent years commercially available and biotechnologically manufactured human skin models have increasingly gained in importance for toxicological testing. The OECD accepts their application for the examination of percutaneous absorption, given absorption of reference chemicals by the skin models is comparable to that by human or porcine skin. To provide evidence a thorough standardisation and validation of the test method is required. For this purpose first of all the skin models were characterised more closely regarding their stability towards the conditions of a permeation experiment. Both viability and integrity tests revealed a clear toxicity of different deficiency media after 6 h incubation with reconstructed epidermis or primary cultured keratinocytes. In both matrices, the addition of 5 % BSA which is advocated by the OECD as additive to the receptor medium for percutaneous absorption studies to facilitate solubility of highly lipophilic substances led to an additional reduction of viability. This fact accounts for the observed inhibition of metabolism of the lipophilic prednicarbate by BSA in reconstructed epidermis and primary keratinocytes. Flow cytometry, specific and non-specific caspase inhibition in the context of the MTT reduction assay as well as fluorescence microscopy after DAPI-staining showed that apoptosis is in fact partly involved in the reduction of keratinocyte viability provoked by deficiency media but is irrelevant for the BSA caused toxicity - the final, BSA-related cell death is a matter of necrosis. These results have to be considered when selecting appropriate receptor media for

percutaneous absorption studies in which metabolism of a substance and accordingly matrix viability are of major importance. Therewith, the OECD recommendation to add 5 % BSA when investigating percutaneous absorption of lipophilic substances should be reviewed.

Cutaneous metabolism of caffeine is of importance because of its topical use as active ingredient in cosmetics and especially because of its exposed position as OECD reference substance. For this reason in the context of this work the metabolism of caffeine was investigated in human skin material - namely in primary keratinocytes, fibroblasts and an epidermal and full thickness skin model - for the first time. For caffeine and the xanthine theophylline which was tested in parallel a concerted HPLC-method was established because of their overlapping metabolic pathways. Both xanthines were metabolised only to a small extent (< 1 %). With respect to the following permeation experiments with caffeine an impact on penetration / permeation of the substance due to metabolism could clearly be ruled out a priori. Metabolism of the xanthines by the monolayer cultures was comparable to that by the skin cultures both qualitatively and quantitatively. Thus, we showed that metabolic capacity of both test systems is similar.

Finally, in the context of this work, first important steps towards standardisation and validation of the test method for determination of percutaneous absorption were undertaken in consideration of the previous results using the OECD reference substance caffeine and the Franz cell technique. Several aspects possibly influencing permeation were investigated experimentally. Thus, a decision was made in favour of the static Franz cell type and different receptor media including the addition of the solubilizer Igepal[®] CA-630 were tested regarding their influence on viability, integrity and permeation. Igepal[®] had to be omitted from further experiments because of its distinct toxicity. In contrast, as additive to the donor compartment analysing lipophilic test substances the use of Igepal[®] appeared tolerable up to a concentration of 2 %.

Comparative investigations with human skin showed that *in vitro* permeation is independent from the age of the donor and the anatomic region of withdrawal (human abdominal and breast skin - or porcine abdominal and back skin were studied). Cryopreserved skin appeared as suitable as fresh skin. This substantially facilitates its use for routine skin absorption studies. Heat separated human epidermis which did not differ from full thickness skin regarding caffeine permeation

was used for the following experiments because the preparation technique is better standardised.

A consistent and improved experimental protocol also containing modifications in the applied concentrations of the substances and the measuring point intervals could be developed and was then applied to comparative permeation tests with different skin matrices. Relevant permeation parameters could be clearly defined: Lag-times of less than 1 h in the skin models for instance allowed a reduction of the duration of the experiment to 8 h. As expected, comparison of the K_p values obtained with caffeine in the skin models with those obtained in porcine or human skin showed an increased permeability of the artificial skin which leads to an overestimation of percutaneous absorption of the tested substances. For a final statement about potential differences in the variability of the permeation data obtained with different matrices the number of experiments has to be clearly increased (as it is planned for the final phase of the validation study presently conducted at the institute) and further test substances have to be included. After all it was shown that neither MTT reduction assay nor histological inspection are adequate quality parameters for the permeability of the exposed skin samples.

The investigations conducted in context of this work demonstrate the complexity of *in vitro* permeation - metabolism experiments which vary in their results in dependence on the experimental protocol. An improved view of the *in vivo* situation seems to be possible. The results also allow a better characterisation of the skin models regarding their stability towards the conditions of penetration / permeation experiments as well as their metabolic capacity. Furthermore, test conditions could be harmonised and optimised. In case the characterisation and testing of further skin models and substances reveals a lower variability of penetration and permeation parameters in comparison to other matrices, in the future human skin models could be applied as test matrices for the determination of percutaneous absorption in the context of safety assessment of chemicals, e.g. within the scope of REACH, of cosmetics and pharmaceuticals for dermal use.