

7. SUMMARY

Reconstructed human skin models are one of the most promising *in vitro* systems that have the potential to replace animal assays in area of topical toxicity testing. However, in regulatory toxicology only highly standardised and commercially available reconstructed human skin models with declared reproducibility within the test batches and over production period are accepted. In addition, tests developed have to be validated to reach the regulatory acceptance.

Experiments performed in this thesis demonstrated that the three evaluated reconstructed human skin models (EpiDerm, EPISKIN and SkinEthic) reveal good performance in all investigated parameters and reflect the standards described in OECD TG 431. Still, when developing and validating new *in vitro* assays, the differences between the reconstructed human skin models must be taken into account. Besides several technical issues related to different storage and culture conditions, attention has to be paid to the different sensitivity to several chemical groups, e.g. surfactants, low concentrated acids, volatile compounds etc. The applicability domain of a new method has to be clearly defined before any validation is performed.

An important part of this thesis was the evaluation of the existing reconstructed human skin models for the testing of skin corrosion potential of industrial chemicals. Two models were included in these studies, SkinEthic and EST-1000. The SkinEthic skin corrosion assay was evaluated in a trial between three laboratories, following the general validation principles. The results obtained were highly concordant with previously validated methods (EpiDerm, EPISKIN and TER assay) and classifications given in OECD TG 431. The outcome is currently reviewed by ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC). The EST-1000 provided results comparable to SkinEthic, too, yet the assay variability has still to be assessed in an inter-laboratory study.

Another task of this thesis was the optimisation of the EpiDerm skin irritation protocol for an upcoming ECVAM skin irritation validation study. Following the idea of the common protocol concept, the EPISKIN protocol (Portes *et al.*, 2002, Cotovio 2003, personal communication and Cotovio *et al.*, 2005), was used as a basis for EpiDerm skin irritation assay. Both reconstructed human skin models provided similar outcome. Moreover, when applying the protocol to the SkinEthic model, almost identical results were obtained. The EpiDerm and EPISKIN skin irritation assays are currently evaluated in an ECVAM validation trial. An ECVAM catch-up validation study with SkinEthic model, based on results presented in this thesis, is in preparation.

Finally, outcome of the phototoxicity feasibility study demonstrates that the reconstructed human skin models could be used for the determination of the phototoxic potency of chemicals and, therefore, the estimation of the safe concentrations at which no acute phototoxic effect can be observed. Particularly, in this study, the human data are of great importance as no validated *in vivo* method exists for the purpose described above. As a next step a validation trial has to be performed with the reconstructed human skin models to reach the regulatory acceptance of the assay.

In this thesis, it has been demonstrated that the reconstructed human skin models show excellent capability for the use in almost all domains of topical toxicity testing, e.g. skin corrosion, skin irritation, and phototoxicity. However, a successful validation is the prerequisite for their implementation in regulatory toxicology.

ZUSAMMENFASSUNG

Rekonstruierte menschliche Hautmodelle gehören zu den vielversprechenden In-vitro Systemen, welche ein großes Potential für den Ersatz von Tierversuchen zur Feststellung topischer Toxizität besitzen. Für eine breitere Anwendung bei der Klärung sicherheitstoxikologischer Fragestellungen eignen sich jedoch lediglich standardisierte und kommerziell erhältliche Modelle reproduzierbarer Qualität. Zudem müssen solche Testsysteme einen Validierungsprozess durchlaufen haben, um behördliche Akzeptanz zu erlangen.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass die drei künstlichen Hautmodelle EpiDerm, EPISKIN und SkinEthic die geforderten Standards der OECD Richtlinie 431 erfüllen. Dennoch mussten die individuellen Besonderheiten einzelner Modelle während der Methodenentwicklung und -validierung berücksichtigt werden. Neben verschiedenen technischen Einzelheiten waren Unterschiede in der Empfindlichkeit bei den Reaktionen auf verschiedene chemische Stoffgruppen, wie Tenside, verdünnte Säuren und flüchtige Substanzen, zu beachten. Die Art der Anwendung musste für jede Methode klar definiert sein.

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Prüfung der beiden Hautmodelle SkinEthic und EST-1000 auf ihre Eignung zur Untersuchung des ätzenden Potentials von Industriechemikalien. Festgelegten Kriterien zur Validierung folgend wurde das Hautmodell SkinEthic einem Ringversuch unter Beteiligung dreier Laboratorien unterzogen. Die Ergebnisse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den zuvor validierten Modellen EpiDerm und EPISKIN sowie dem TER-Test; die Klassifizierungen entsprachen der OECD Richtlinie 431. Diese Ergebnisse werden zur Zeit vom wissenschaftlichen Beirat der ECVAM (ESAC) beurteilt. Obwohl das Modell EST-1000 vergleichbare Ergebnisse zum Modell SkinEthic gezeigt hat, muss die Testvariabilität noch in einem Interlaborvergleich festgestellt und beurteilt werden.

Ein weiteres Thema dieser Dissertation war die Optimierung eines Protokolls für die Verwendung des EpiDerm-Modells in einer ECVAM-Validierungsstudie zur Bestimmung des hautreizenden Potentials *in vitro*. Gemäß des Konzepts zur Erstellung eines Protokolls, welches das Ziel der gemeinsamen Anwendung bei unterschiedlichen Modellen verfolgt ("Common Protocol Concept"), wurde das Protokoll zur Feststellung der Hautreizung des Modells EPISKIN (Portes *et al.*, 2002, Cotovio, 2003 und Cotovio *et al.*, 2005) als Grundlage für das Modell EpiDerm verwendet. Die Untersuchung erbrachte eine gute Vergleichbarkeit beider Modelle. Ferner konnte dieses Protokoll für das Modell SkinEthic angewendet

werden. Zur Zeit befinden sich die Protokolle zu den Modellen EpiDerm und EPISKIN in einer ECVAM-Validierungsstudie. Eine zusätzliche "Catch-Up"-Studie für das Modell SkinEthic ist in Vorbereitung.

Im letzten Teil der Dissertation wurde ein künstliches Hautmodell auf seine Eignung für die Untersuchung des phototoxischen Potentials chemischer Stoffe durchgeführt, um die Konzentration einer Substanz bestimmen zu können, bei deren topischer Applikation kein akuter phototoxischer Effekt auftritt. Speziell für diese Fragestellung war der Vergleich zu Daten, die beim Menschen gewonnen wurden, von Bedeutung, da keine anerkannte *In-vivo* Methode existiert. Zur Erlangung behördlicher Akzeptanz muss für die Anwendung der Hautmodelle als *In-vitro* Phototoxizitätstests eine Validierungsstudie erfolgen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die exzellente Eignung rekonstruierter menschlicher Hautmodelle für ihre Anwendung in den wichtigen Bereichen der topischen Toxizitätsuntersuchung, d.h. Hautätzung, Hautreizung und Phototoxizität, aufgezeigt werden. Dennoch ist eine erfolgreiche Validierung der Modelle eine grundsätzliche Voraussetzung für ihre Aufnahme in die behördlichen Richtlinien zur Sicherheitstoxikologie.