

## **Können menschliche 3D Hautmodelle zur toxikologischen Dosimetrie beitragen ? – Fallbeispiele**

GT Herbstworkshop, 14.10.2008, Berlin

“Dosimetrische Extrapolationsmöglichkeiten von in vitro Daten auf die in vivo Situation”

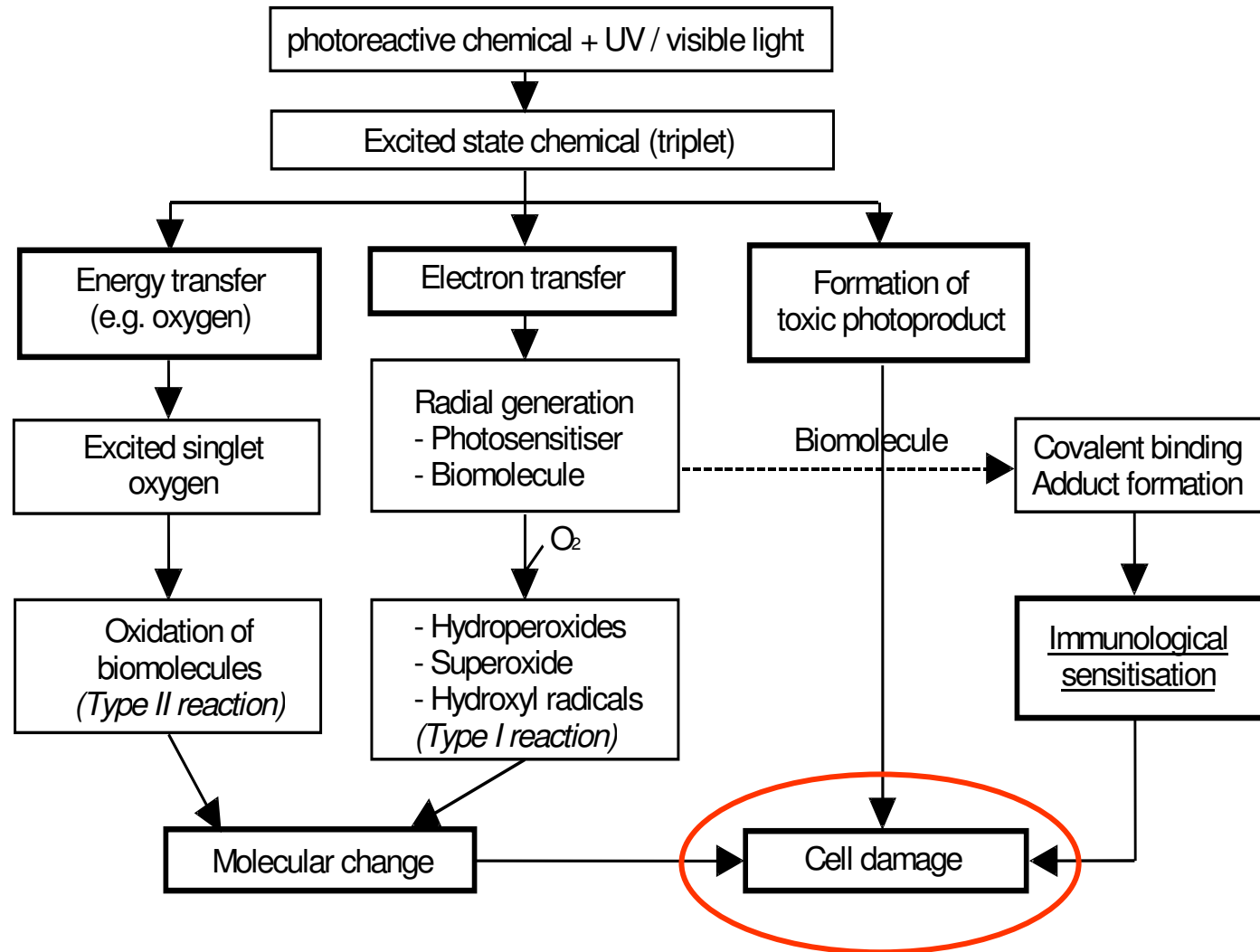
---

Manfred Liebsch

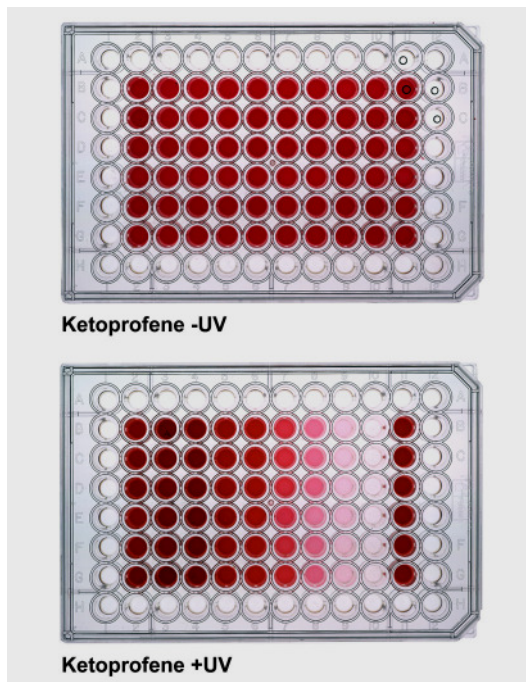
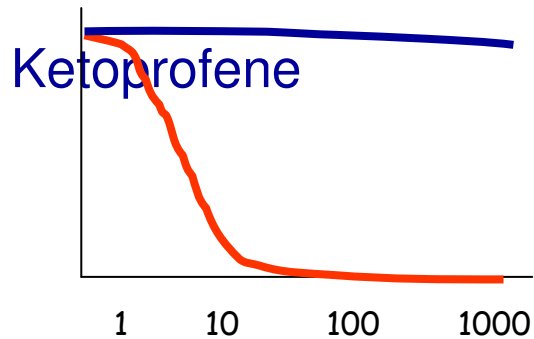
Bundesinstitut für Risikobewertung

FG 37 Alternativmethoden zu Tierversuchen - ZEBET

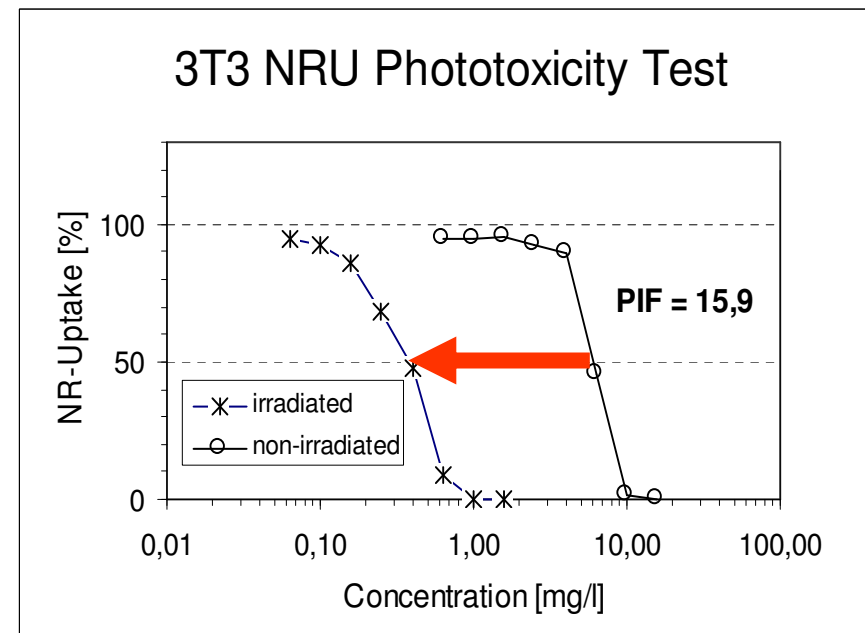
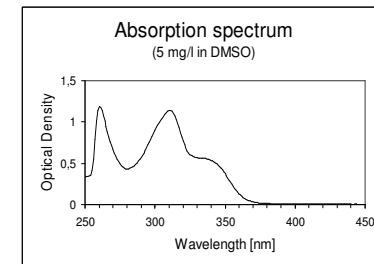
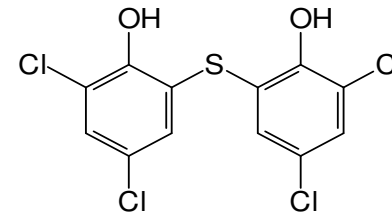
# Die genaue Kenntnis der Mechanismen von Phototoxizität ...



# ... erlaubte die Entwicklung des 3T3 NRU PT (OECD TG 432)

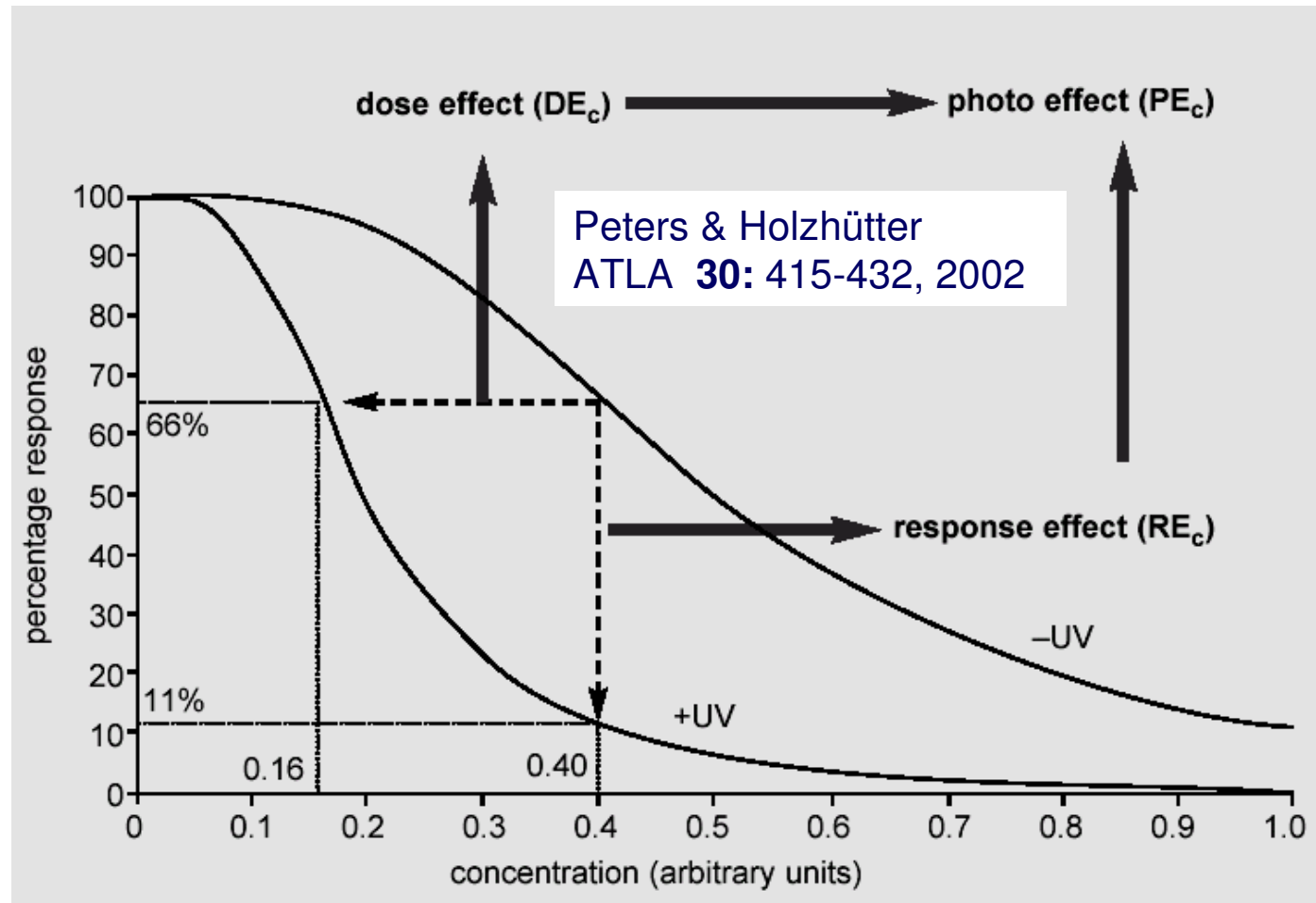


## Bithionol



Graphs: Wolfgang Pape, Beiersdorf

# ...mit einem wissenschaftlich entwickelten Vorhersagemodell für phototoxisches Potential



...basierend auf dem kompletten Vergleich der Unterschiede zwischen einem bestrahlten und unbestrahlten Parallelexperiment

# Aber...

Während der 3T3 NRU PT das phototoxische Potenzial eines Stoffes korrekt anzeigt,

erlaubt er nicht

- (1) Die Bewertung der Potenz eines Phototoxins bei *in vivo* Exposition auf der Haut
- (2) die Bewertung der Sicherheit, wenn ein Phototoxin topisch auf der Haut eingesetzt werden soll (photosafety)

## Deshalb ...

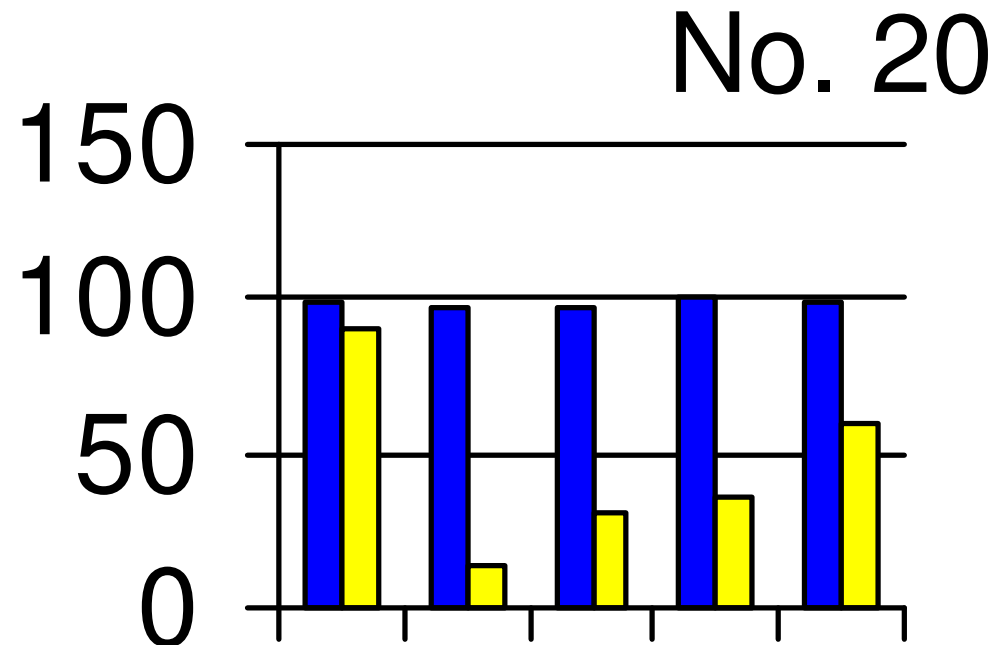
haben wir 1993 einen Phototoxizitätstest mit einem menschlichen 3D Epidermismodell entwickelt (3D HPT) und propagieren diesen Test seither als zweite Stufe einer Teststrategie, wenn PIF oder MPE ein phototoxisches Potential anzeigen, aber der Stoff dennoch topisch auf der Haut eingesetzt werden soll. Im Fall, dass der im 3D HPT ermittelte "NOAEL" mit Sicherheitsabstand in einem relevanten Dosisbereich liegt, kann dieses Ergebnis an Probanden im Photopatchtest in einer dritten Stufe der Strategie bestätigt werden.

Liebsch, M., Döring, B., Donnelly, T.A., Logemann, P., Rheins, L.A. & Spielmann, H. (1995). Application of the human dermal model Skin<sup>2</sup> ZK 1350 to phototoxicity and skin corrosivity testing. *Toxic. in Vitro* **9**, 557 - 562

# Geschichte: erste Hinweise 1993

	<i>Mechanistic Assays</i>			<i>Commercial Assays</i>		<i>Growth Inhibition Assays</i>				
	Histidine Photo-oxidation	RBC Photo-hemolysis	RBC Photo-Hb-oxidation	SOLA-TEX PI	Skin <sup>2</sup> ZK 1300 ZK 1350	Yeast growth inhib.	human lympho-cytes MTT	human keratino-cytes NRU	<b>Common standard 3T3-NRU PT test</b>	
<b>Class I UV-absorbing, phototoxic</b>										
1	Promethazine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Chlorpromazine	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+
3		6-MC	+	+	+	+	-	+	+	+
4	TCSA	+	+	+	+	+	-	+	+	+
5	Doxycycline	+	-	+	+	+	+	+	+	+
6	8-MOP	+	-	(+)	-	+	+	-	+	+
7	Tetracycline	+	-	+	+	+	-	-	+	+
9	Amiodarone	-	+	-	+	+	+	+	-	+
10	Bithionol	-	+	+	+/-	-	-	+	+	+
11	Neutral Red	+	+	-	+	+	-	+	+	+
12	Rose Bengal	++	+	(+)	+	+	+	n.t.	+	+
<b>Class II UV-absorbing, non-phototoxic</b>										
8	Piroxicam *	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Cinnamic Ald.	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Chlorhexidine	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
15	Uvinul MS 40	-	-	-	+	-	-	-	-	-
16	PABA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Class III non UV-absorbing, non-phototoxic</b>										
17	Penicillin G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	L-Histidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Thiourea	-	-	-	n.q.	-	-	-	-	-
20	Lauryl Sulfate	-	-	-	-	-	-	-	-	-

# Der Skin<sup>2</sup> 3D HPT verhielt sich wie „in vivo“



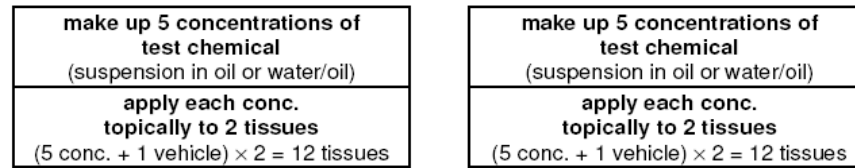
Anthracene (hier 0.1-10 %, 100 $\mu$ L / cm<sup>2</sup>)  
zeigt „umgekehrte“ Dosis-Wirkung  
weil der Überschuss auf dem Stratum corneum  
des Hautmodells als Lichtschutzfilter wirkt !



# 3D HPT

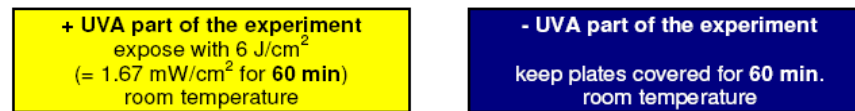
## First day of testing (Wednesday)

transfer tissues from shipping agarose to assay medium  
incubate 1 hr. (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)  
replace medium



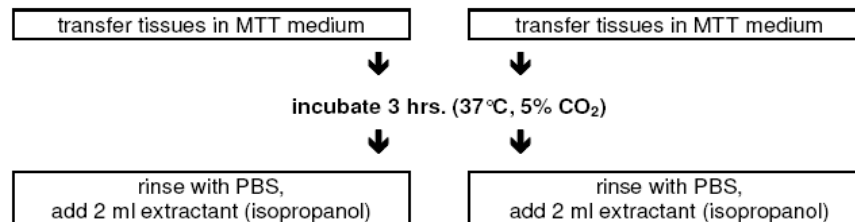
incubate over night 18-24 hrs. (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)

## Second day of testing (Thursday)



incubate over night 18-24 hrs. (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)

## Third day of testing (Friday)



shake plates for 2 hrs.

detect OD of formazan extract (cell viability) at 570 nm or 540 nm

Liebsch, M., Barrabas, C., Traue, D. & Spielmann, H. (1997)

Entwicklung eines neuen *in vitro* Tests auf dermale Phototoxizität mit einem Modell menschlicher Epidermis, EpiDerm™. Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX) 14, 165-174

# ECVAM Prävalidierung des 3D HPT

chemical	run	Beiersdorf		P & G		ZEBET	
		Diff	pred.	Diff	pred.	Diff	pred.
Chlorpromazine	1	44.7	pt	44.9	pt	45	pt
	2	40.6	pt	39.3	pt	74.4	pt
Acridine hydrochloride	1	67.3	pt	91.6	pt	91	pt
	2	86.1	pt	92.2	pt	92.8	pt
Bergamot oil	1	60.4	pt	50.1	pt	79.6	pt
	2	74.1	pt	52.1	pt	78.4	pt
Neutral red	1	69.8	pt	54.8	pt	39.9	pt
	2	74.2	pt	78.1	pt	84.9	pt
Tetracycline free base	1	25.5	npt	10.4	npt	39.1	pt
	2	7.8	npt	7.2	npt	36.6	pt
Penicillin G	1	7.6	npt	-4.3	npt	0.9	npt
	2	11.2	npt	39.3	pt	15.5	npt
Lauryl sulfate sodium	1	19.1	npt	-1.7	npt	6.7	npt
	2	1.3	npt	8.3	npt	11.2	npt
Octyl salicylate (S 13)	1	13.3	npt	-2.3	npt	3.1	npt
	2	-7.4	npt	-0.3	npt	2.7	npt
4-Methylbenzylidene camphor (S60)	1	13.4	npt	-8.5	npt	-2.8	npt
	2	-5.2	npt	-1.6	npt	2.3	npt
Octyl methoxy-cinnamate (S28)	1	10.7	npt	3.7	npt	7.4	npt
	2	-1.7	npt	13.7	npt	30.2	pt

**Dann 2002 eine Machbarkeitsstudie ...**

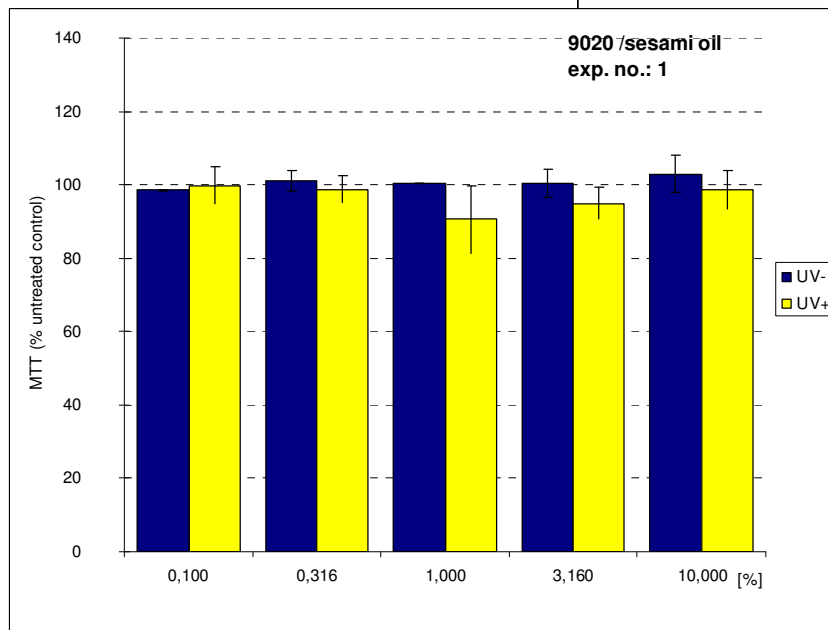
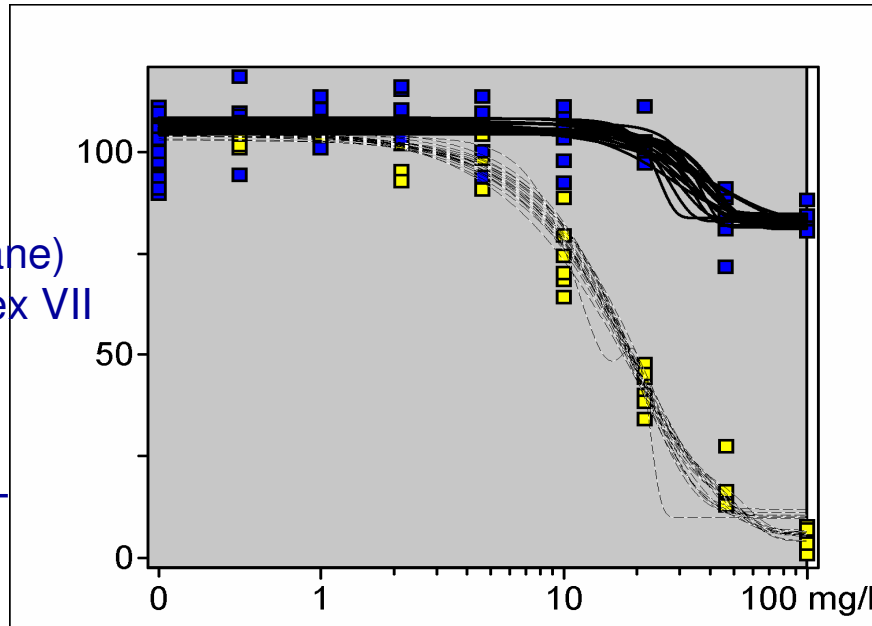
**ECVAM FEASIBILITY STUDY ON WHETHER THE  
PREVALIDATED HUMAN 3-D EPIDERMIS MODEL  
*IN VITRO* PHOTOTOXICITY TEST (EpiDerm-PT)  
COULD SUCCESSFULLY BE USED FOR  
PHOTOTOXIC POTENCY TESTING**

**Contract No. 19868-2002-09 F1ED ISP DE**



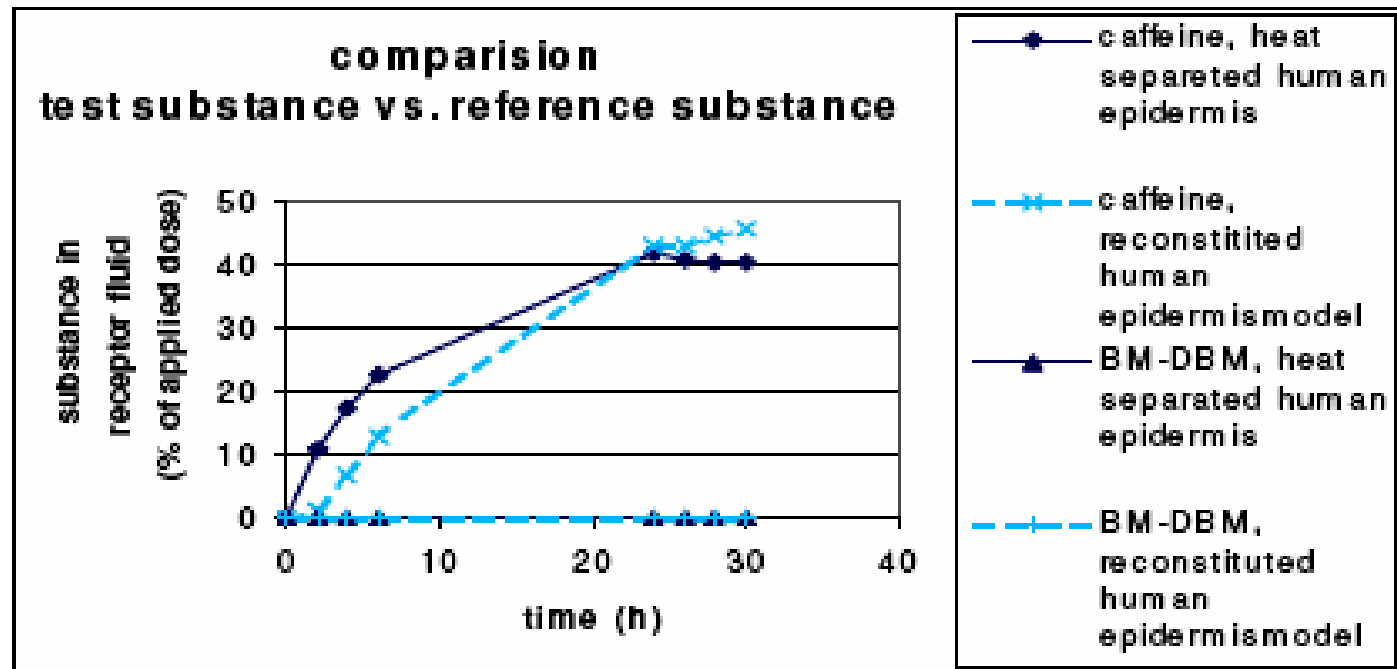
# Ways forward...

The UVA filter DM-DBM  
(Butyl methoxy-dibenzoylmethane)  
listed as safe up to 5% in Annex VII  
of  
Cosmetics Directive  
provided significant  
phototoxicity in the 3T3NRU-PT



...and did not show any phototoxicity  
In the 3D HPT

# BM-DBM zeigt keine Penetration durch die Haut



compartments	donor fluid in %	epidermis sheets in %	receptor fluid in %	recovery rate in % *
heat separated human epidermis	94,9 ± 5,18	0,7 ± 0,35	0	95,7 ± 5,11
reconstituted human epidermis model	93,5 ± 5,73	0,3 ± 0,15	0	93,8 ± 5,86

\*OECD TG 428 acceptance range: 100 ± 10 %

2006  
S. Trauer  
Diplomarbeit

# Ways forward...

Bergamot oils obtained from various suppliers differ in phototoxicity detected by 3T3 NRU PT

## **AIM OF THE STUDY:**

identification of differences in content of photoactive components depending on different solvents (~ intended use in finished products) using different tests in vitro / in vivo

## **TIERED TESTING STRATEGY :**

- 1. spectral + chemical analysis**
- 2. *in vitro* 3T3 NRU PT**
- 3. *in vitro* EpiDerm 3D HPT**
- 4. *in vivo* human skin photopatch test in a group of volunteers**

# (1a) UV-vis absorption spectra

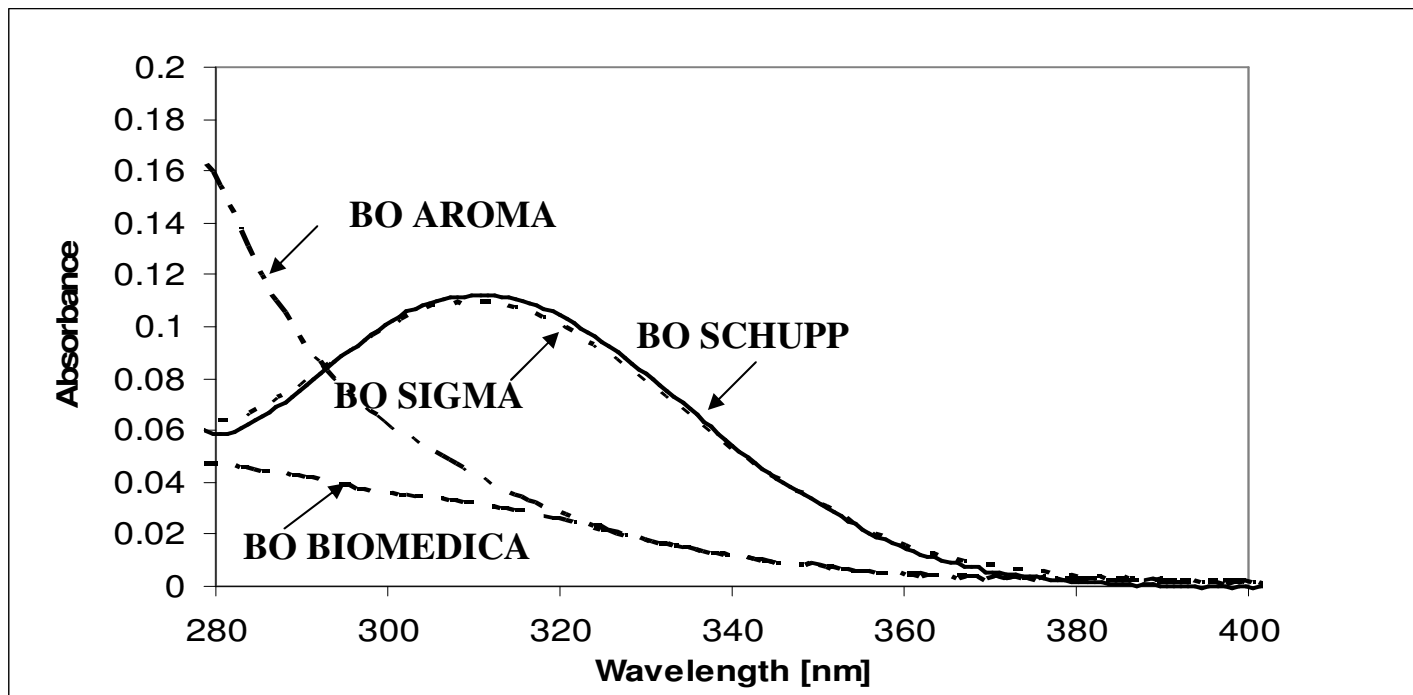
Bergamot oil (CAS No. 8007-75-8): different suppliers

AROMA s.r.o.(CR)

BIOMEDICA s.r.o. (CR)

SIGMA AG (G)

SCHUPP GmbH (G)



## (1b) Content of photoactive substances

Content (%) of Furocoumarins in BO (GC chromatography)

component	% in bergamot oil			
	AROMA	BIOMEDICA	SIGMA	SCHUPP
<b>neral</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.48</b>	<b>0.43</b>
<b>geranial</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.04</b>	<b>n.d.</b>
<b>bergamoten</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.86</b>	<b>0.83</b>
<b>citropten</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.13</b>	<b>0.19</b>
<b>bergapten</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0.13</b>	<b>0.18</b>



## (2a) Phototoxicity in 3T3 NRU PT

Bergamot oil	Solvent	Run	PIF	MPE
AROMA	Ethanol (1% in PBS)	1	1.218	0.027
		2	1.067	-0.004
	DMSO (1% in PBS)	1	1.006	0.005
		2	1.185	-0.038
	PBS	1	1.075	0.004
		2	0.905	0.064
BIOMEDICA	Ethanol (1% in PBS)	1	1.377	-0.004
		2	1.178	0.016
	DMSO (1% in PBS)	1	1.051	0.003
		2	0.904	-0.017
	PBS	1	1.310	0.113*
		2	1.113	0.031

\* probably phototoxic \*\* phototoxic

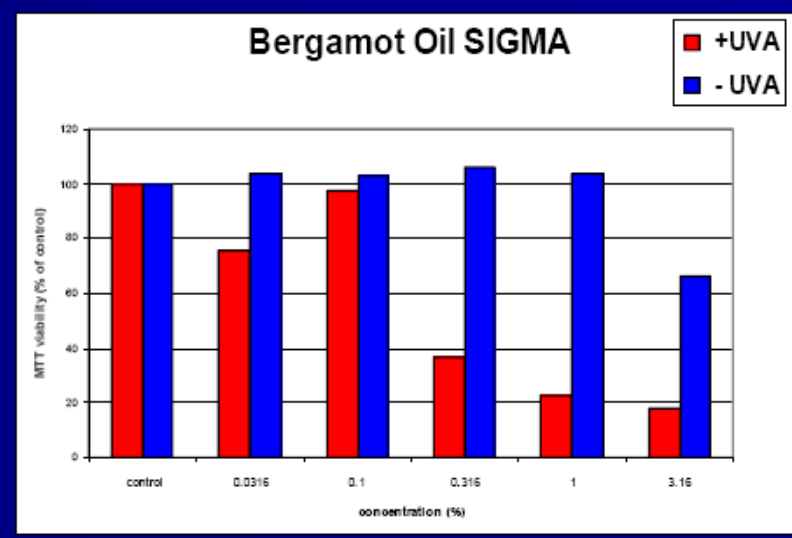
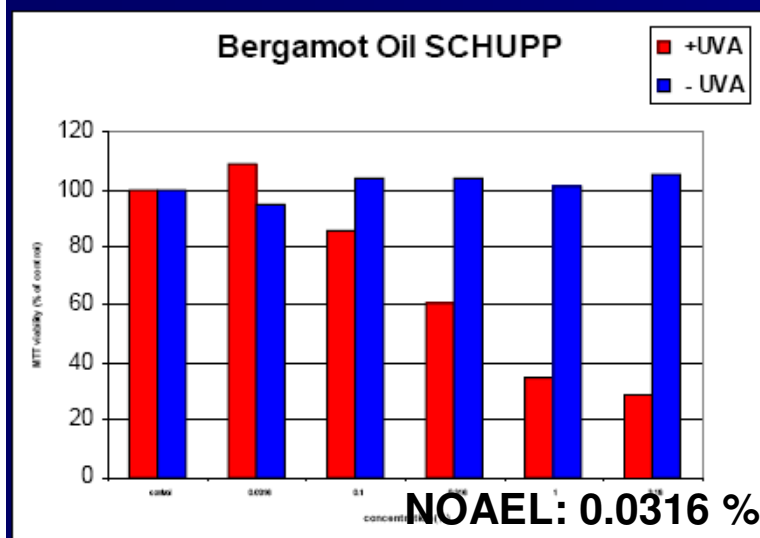
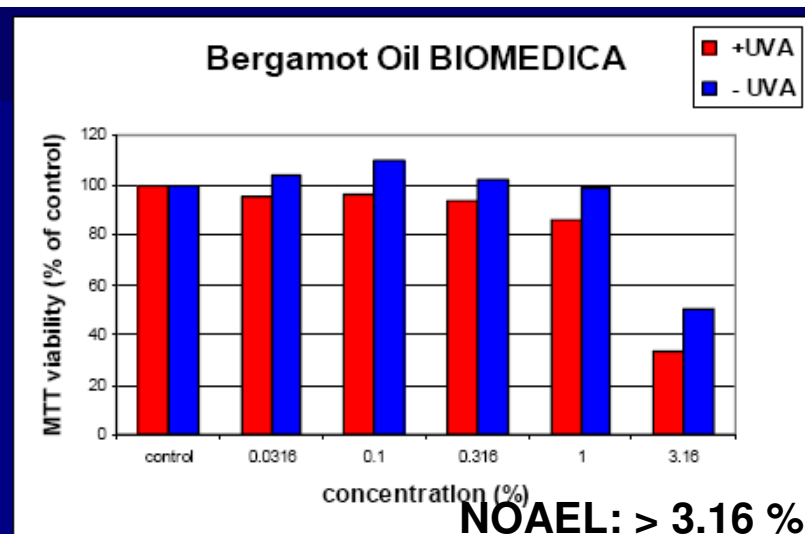
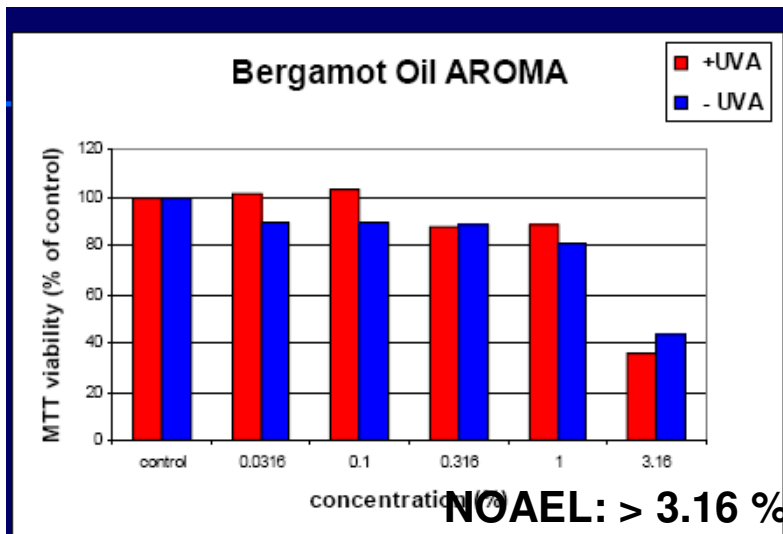
## (2b) Phototoxicity in 3T3 NRU PT

Bergamot oil	Solvent	Run	PIF	MPE
SIGMA	Ethanol (1% in PBS)	1	1.159	0.000
		2	1.383	0.147*
	DMSO (1% in PBS)	1	1.266	0.048
		2	1.666	0.144*
	PBS	1	1.648	0.017
		2	2.380*	0.232**
SCHUPP	Ethanol (1% in PBS)	1	1.126	0.126*
		2	1.358	0.156**
	DMSO (1% in PBS)	1	1.419	0.081
		2	1.410	0.088
	PBS	1	2.581*	0.289**
		2	3.415*	0.348**

\* probably phototoxic \*\* phototoxic

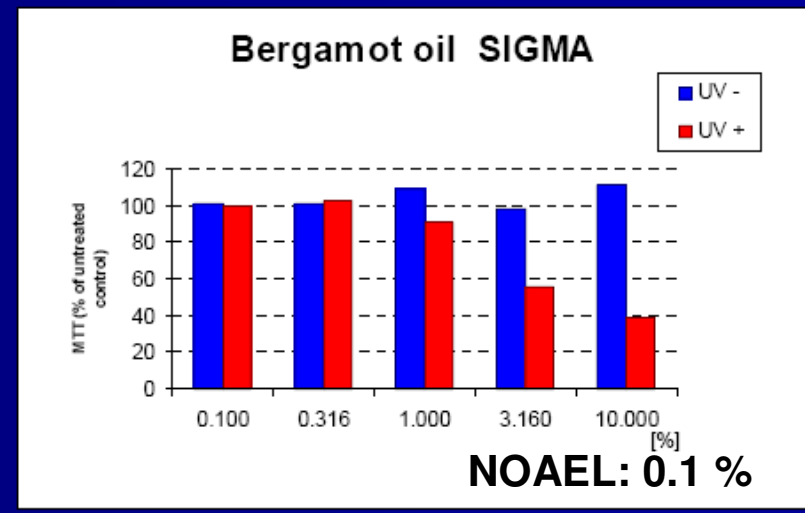
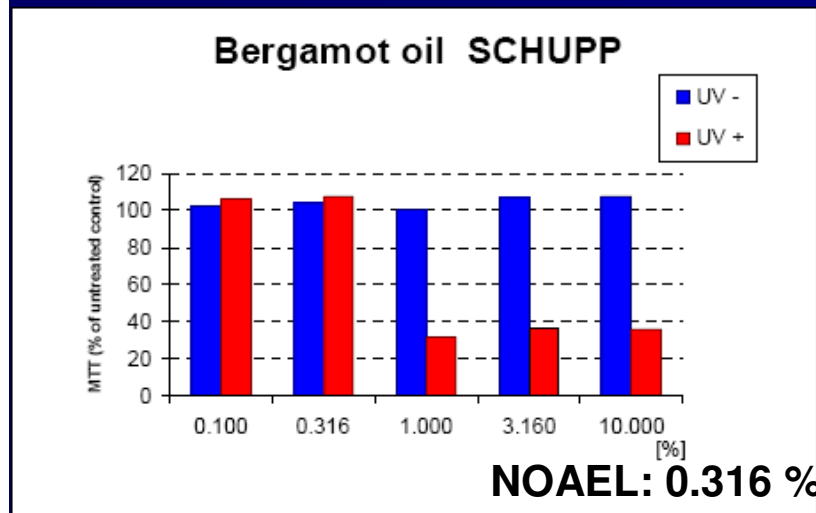
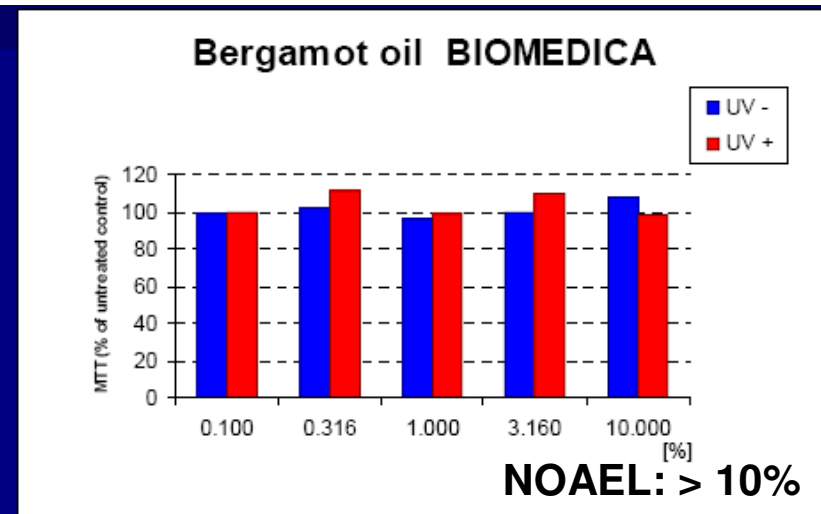
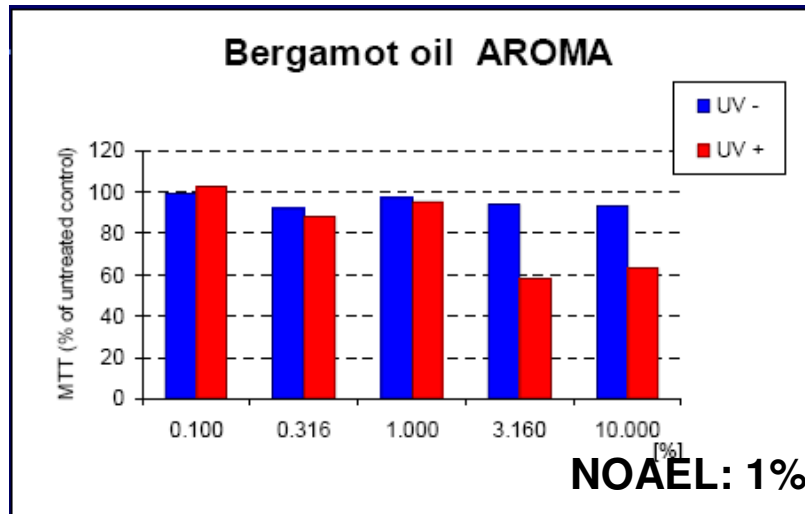
# (3a) EpiDerm 3D HPT

vehicle: water



# (3a) EpiDerm 3D HPT

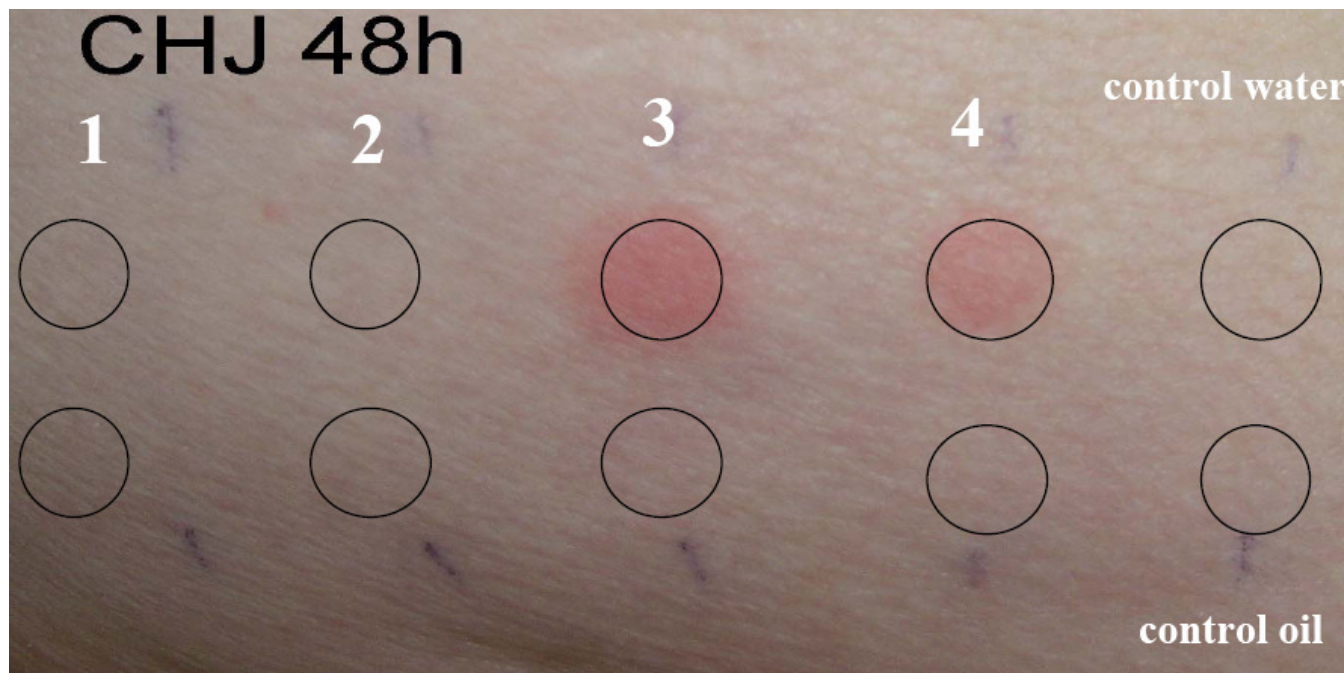
vehicle: oil



## (4) Human photopatchtest (HPPT)

Tested: highest non-phototoxic concentrations (NOAELs)

1	2	3	4	CONTROL
AROMA	BIOMEDICA	SIGMA	SCHUPP	
1% (W)	1%(W)	0.1% (W)	0.0316% (W)	
1% (O)	10%(O)	0.316%(O)	0.1% (O)	



## 3T3 NRU PT vs. 3D HPT - kindly provided by Beiersdorf

3T3 NRU PT				H3D PT EpiDerm		
#	NR50- [mg/l]	NR50+ [mg/l]	PIF		C max	Solvent
1	> 1000	54,7	> 18,3	negative	1%	EtOH
2	> 1000	94,9	> 10,5	negative	10%	EtOH
3	94,1	2,17	43,4	positive	1%	EtOH
4	397	130	3,1	negative	3%	EtOH
5	28,7	5,67	5,1	negative	3%	EtOH
6	43,4	4,15	10,5	positive	1%	EtOH
7	> 1000	85,6	> 11,7	negative	1%	EtOH
8	> 10000	447	> 22,4	negative	0,30%	EtOH
9	68,8	7,9	8,7	negative	0,30%	EtOH
10	44,1	2,74	16,1	negative	1%	EtOH
11	> 200	21,4	> 9,1	negative	1%	EtOH
12	8,13	2,07	3,9	negative	0,30%	EtOH
13	20,6	0,181	113,5	positive	0,30%	EtOH
14	> 300	50,5	> 5,9	negative	1%	EtOH
15	> 100	1,54	> 64,7	negative	1%	EtOH
16	537	12	44,9	negative	10%	Aqua
17	> 100	6,27	> 16,0	negative	1%	EtOH
18	> 600	165	< 3,6	negative	1%	EtOH
19	> 600	278	> 2,2	negative	1%	EtOH
20	> 400	46,9	> 8,5	negative	3%	EtOH

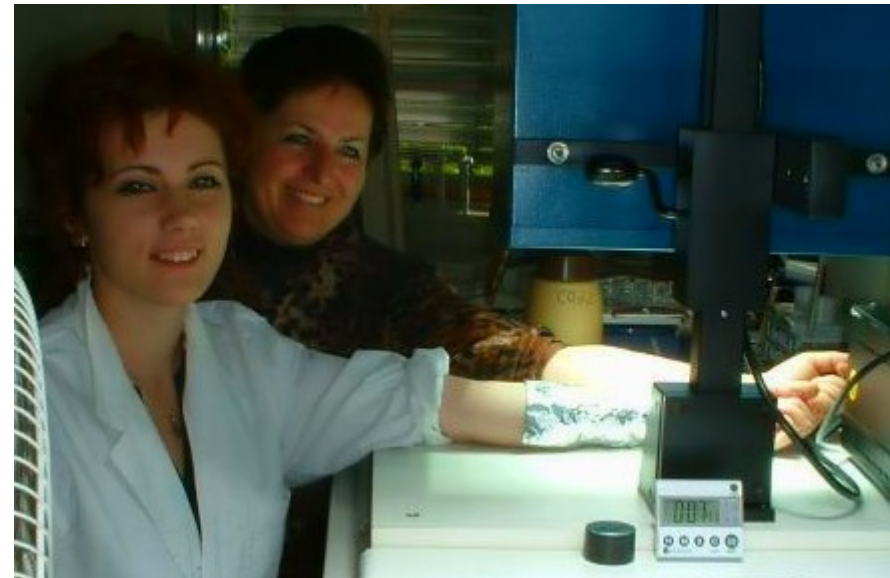
3T3 NRU PT				H3D PT		
#	NR50- [mg/l]	NR50+ [mg/l]	PIF		C max	Solvent
21	> 800	41,6	> 19,2	negative	3%	EtOH
22	> 500	9,08	> 55,1	negative	1%	DMSO
23	> 100	11,9	> 8,4	?	1%	EtOH
24	146	2,2	67,7	negative	3%	Aqua
25	45,3	11,9	3,8	negative	1%	EtOH
26	355	59,3	6	negative	10%	EtOH
27	> 400	93,5	> 4,3	negative	10%	Sesamöl
28	4660	193	24,2	negative	10%	EtOH
29	> 500	102	> 4,9	negative	10%	EtOH
30	126	12,5	10,1	negative	10%	EtOH
31	436	53,2	8,2	negative	10%	EtOH
32	458	183	2,5	positive	10%	Aqua
33	> 800	313	> 2,6	positive	1%	EtOH
34	> 200	33,5	> 6,0	negative	10%	EtOH
35	77,9	4,96	15,7	negative	10%	EtOH
36	157	4,19	37,6	negative	1%	EtOH
37	> 100	0,869	> 103	negative	10%	EtOH
38	> 1000	13,2	> 76	negative	1%	Aqua
39	> 1000	25,1	> 39,8	negative	0,50%	Aqua

# Schlußfolgerungen

1. *In vitro* 3D Hautmodelle können irrelevant (nicht falsch!) positive Ergebnisse aus zellulären *in vitro* Phototoxizitätstests entlasten
2. Sie nehmen dabei eine Rolle ähnlich der *in vivo* Bestätigungstests von positiven Ergebnissen aus zellulären Tests der Genotoxizitätstestung ein
3. CAVE: das geht bisher nur bei dem Endpunkt Phototox, da hier der Metabolismus keine relevante Rolle spielt.
4. Im Bereich der Phototoxizitätstestung (bekannter) Rohmaterialien von Kosmetik-Inhaltsstoffen kann der im Hautmodell bestimmte NOAEL am Menschen getestet werden (Sicherheitsabstand!)

## Danke an:

Helena Kandarova, BfR / MatTek  
Juno Eom (FDA Korea)  
Dagmar Jirova, SZU  
Kristina Kejlova, SZU  
Julian Tharmann, BfR  
Sindy Trauer, BfR  
Uwe Pfannenbecker, Beiersdorf



**...und danke für  
Ihre  
Aufmerksamkeit**

Manfred Liebsch