

OrthoCell AG
Kantonsstr. 52b
CH-8863 Buttikon

Münster, 09. Juni 2021

In vitro Irritationstestung der Haut gemäß OECD TG 439

Entwicklung der Vitalität in humanen EpiDerm™ 3D-Modellen
nach Applikation des Testproduktes

OrthoCell balance OH- Lösung

Auftraggeber:	OrthoCell AG
Gewebekultur:	EpiDerm™ 3D-Modell; MatTek Corporation, USA
Applikationszeit:	1 Stunde + 42 Stunden Postinkubation (TG 439)
Produktauftrag:	einmalige, topische Applikation von 30 µl Produkt
Versuchsprotokoll:	EPI-200-SIT (OECD TG 439)
Analysemethode:	MTT-Viabilitätstest
biolog. Endpunkt:	Gewebe- / Zellvitalität

Zusammenfassung:

Die Testsubstanz **OrthoCell balance OH- Lösung** wurde anhand des in Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT) Protokolls (ECVAM Datenbank) gemäß OECD TG 439 mit zwei Konzentrationen (unverdünnt und 1:5 Verdünnung in Wasser) auf eine potentiell hautirritierende Wirkung hin untersucht. Dazu wurden EpiDerm™ 3D-Epidermismodelle verwendet und deren Vitalität nach Applikation der Testsubstanz anhand eines MTT-Viabilitätstests analysiert.

Es wurden einmalig 30 µl einer **OrthoCell balance OH- Lösung** Lösung topisch appliziert und für 1 Stunde + 42 Stunden Postinkubation auf den Modellen inkubiert. Als Negativkontrolle (Referenz, 100 % Vitalität) wurde steriles PBS (Phosphat-gepufferte-Salinelösung) verwendet. Als Positivkontrolle wurde 5 % wässrige Natriumlaurylsulfatlösung (SLS) genutzt. Alle Testungen wurden im Triplikat durchgeführt (3 unabhängige Modelle).

Wie Abbildung 3 zu entnehmen ist, lag die durchschnittliche Gewebevitalität nach 1-stündiger Inkubation und anschließender 42-stündiger Postinkubation mit der Testsubstanz bei 99,14 % (unverdünnt) und 101,34 % (1:5 Verdünnung in Wasser). Gemäß UN GHS, implementiert in die EU CLP Klassifizierung ist die Testsubstanz **OrthoCell balance OH- Lösung** als nicht irritierend einzustufen. Das Produkt unterliegt nicht der Kennzeichnungspflicht.

1. Einleitung

Heutzutage gewinnen *in vitro* Testverfahren als sehr gute Alternative zu bisher notwendigen Tierversuchen in der kosmetischen Industrie immer mehr an Bedeutung. Für Produkte, die oft über einen langen Zeitraum verwendet werden, ist eine dermatologische Testung auf Unbedenklichkeit eine essentielle Voraussetzung für eine hohe Anwendungssicherheit und Kundenzufriedenheit. Bei der Entwicklung neuer Produkte treten biologische Effekte von einzelnen aktiven Ingredienzien oder auch vollständigen Rezepturen immer mehr in den Fokus des kosmetischen Interesses. Durch die Bestimmung und Bewertung verlässlicher und reproduzierbarer biologischer Endpunkte kann eine Aussage über die Einflüsse eines Produktes auf regenerative, protektive, irritierende oder korrosive biologische Prozesse der Haut getroffen werden.

EPI-200-SIT OECD TG 439

Das zu Grunde liegende Protokoll ist eine anerkannte Alternative zum *in vivo* Draize Test am lebenden Organismus. Es wurde durch die ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) als gleichwertiger Ersatz zur Vorhersage des irritierenden Potentials von Substanzen validiert. Das Protokoll ist darüber hinaus geeignet, irritierende Substanzen zu identifizieren und nach der harmonisierten UN GHS (Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals) zu klassifizieren (R38 / Kategorie 2 oder keine Kategorie).

1.1 Das humane EpiDerm™ 3D-Epidermismodell

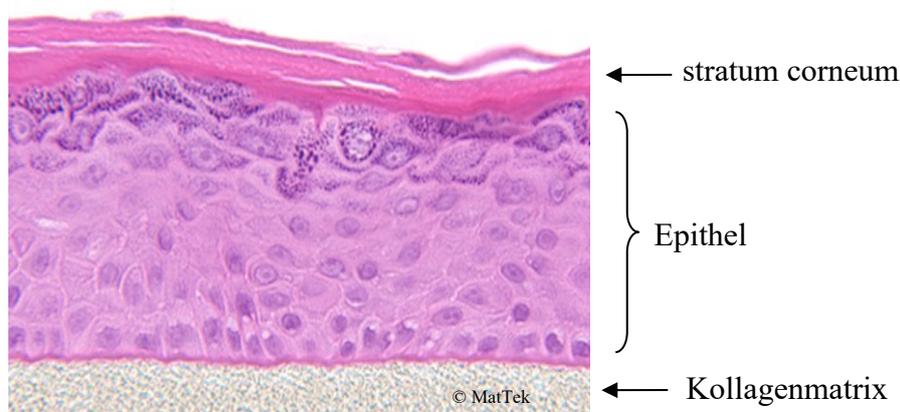


Abb.1 Das EpiDerm™ 3D Epidermismodell
Histologisches Präparat eines EpiDerm™ 3D-Epidermismodells (Hämatoxylin & Eosin Färbung).

Das humane EpiDerm™ 3D-Epidermismodell ist ein *in vitro* rekonstruiertes, mehrschichtiges epitheliales Gewebe, welches aus normalen humanen Keratinozyten auf einer kollagenhaltigen Matrix gezüchtet wird. Es kann bis zu zwei Wochen an der Luft-Flüssigkeitsschicht kultiviert werden. Das Modell weist alle typischen Schichten (stratum basale-, spinosum-, granulosum-, und stratum corneum) normaler menschlicher Haut auf, ist sowohl mitotisch als auch metabolisch aktiv, exprimiert typische Differenzierungsmarker wie Pro-Fillagrin & Zytokeratin 1/10 und zeigt ein mit menschlicher Haut vergleichbares Lipidprofil. Ebenso besitzt das Modell viele Eigenschaften der menschlichen Hautbarriere, wodurch es sich sehr gut für kosmetische Anwendungstestungen & *in vitro* Analysen wie Korrosions- und Irritationstestungen eignet [1-3].

2. Material & Methoden

In der vorliegenden Studie wurden EpiDerm™ 3D-Epidermismodelle verwendet, um eine potentiell irritierende Eigenschaft des Produktes **OrthoCell balance OH- Lösung** zu untersuchen. Die Testung erfolgte anhand des validierten Protokolls in Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), welches OECD TG 439 konform ist. Diese Testung ist allgemein als gleichwertiger Ersatz für *in vivo* Hautirritationstestungen (Draize-Test, OECD TG 404, 405) an Kaninchen anerkannt. Die Testungen werden zur Identifikation und Klassifizierung des irritierenden Potentials von Substanzen verwendet, um die rechtlichen Mindestanforderungen der Erfassung, Bewertung, Zulassung und Eingrenzung von Chemikalien zu erfüllen. Anhand des Testes kann das Gefahrenpotential von Feststoffen, Flüssigkeiten, halbfesten Stoffen, in Wasser löslichen oder unlöslichen Stoffen, nicht jedoch von Gasen oder Aerosolen, in Mono- oder Multikomponententestprodukten bestimmt werden.

Die Testung nach OECD TG 439 ermöglicht die Identifikation von hautirritierenden Substanzen und deren Klassifizierung nach EU (R38) oder „keine Kennzeichnungspflicht, no label“ (nicht hautirritierende) und GHS (Kategorie 2) Substanzen.

2.1 Kultivierung der Modelle

Die verwendeten 3D-Modelle (EpiDerm™) wurden bei der Firma MatTek, Ashland, USA erworben und unter idealen atmosphärischen Bedingungen bei 37°C, 95 % H₂O und 5 % CO₂ nach Angaben des Herstellers kultiviert.

2.2 Produktapplikation

30 µl des **OrthoCell balance OH- Lösung** (wässrige Lösung, pH-Wert 12,24 unverdünnt und 11,56 1:5 Verdünnung in Wasser) wurden topisch appliziert und für 1 Stunde auf den Modellen inkubiert. Nach Entfernung der Testsubstanz wurden die Modelle für weitere 42 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle wurden 30 µl 5 % wässrige Natriumlaurylsulfatlösung (SLS) verwendet. Als Negativkontrolle wurden 30 µl steriles PBS verwendet (Phosphat-gepufferte-Salinelösung). Die Applikation erfolgte jeweils im Triplikat.

2.3 verwendete Chemikalien

- MTT Stocklösung: 5 mg/ml in PBS
- MTT Gebrauchslösung: 1 mg/ml in Medium
- PBS (Phosphat-gepufferte-Salinelösung)
- 5 % wässrige Natriumlaurylsulfatlösung (SLS)
- azider Isopropanol: 0,04 N HCL in Isopropanol
- Assay-Medium (MatTek)

2.4 Der MTT-Viabilitätstest

Viabilität ist als allumfassende Kapazität des Lebens definiert. Unter diesem Begriff summieren sich alle metabolischen Aktivitäten, welche die Zelle für den existentiellen Grundbedarf, Wachstum und Teilung benötigt (Bsp: Respiration, Glykolyse etc.). Eine etablierte Methode, um Viabilität in Geweben zu messen, ist der MTT-Viabilitäts-Test. 3-(4,5-Dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid oder kurz MTT, ist ein gelbes, wasserlösliches Salz, welches im Zellinneren durch die Spaltung des Tetrazolium-Rings reduziert und in wasserunlösliches, purpur-blaues Formazan umgewandelt wird [4].

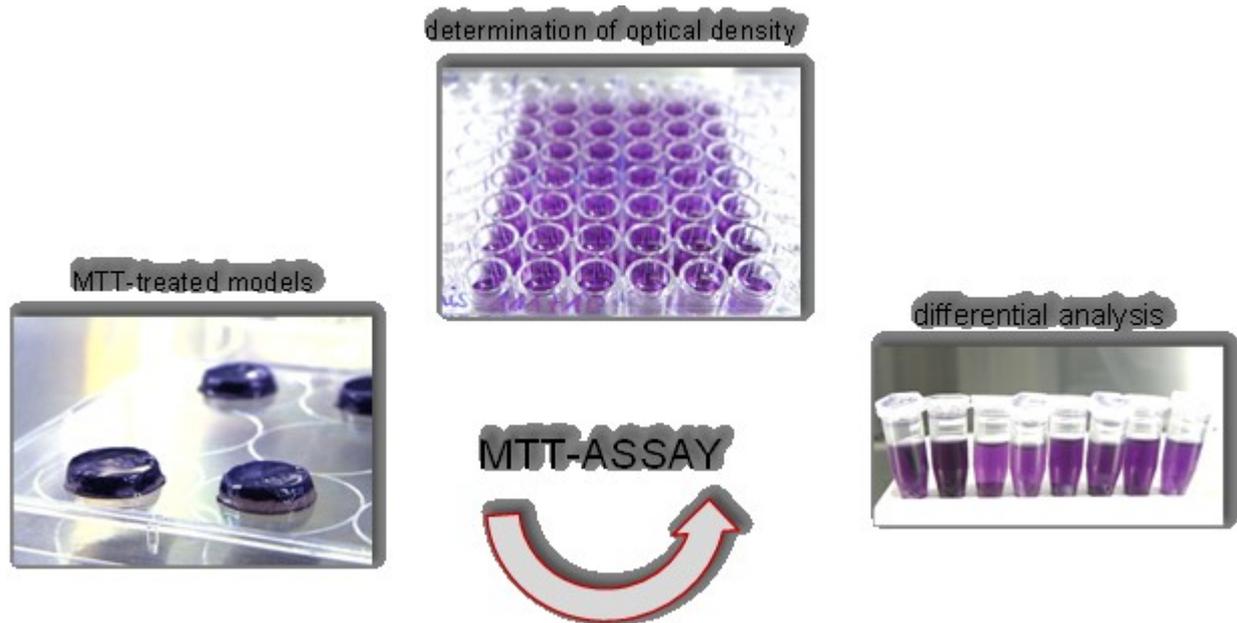


Abb. 2 exemplarische Darstellung eines MTT-Tests

Die Hautmodelle werden in einem Medium /MTT-Gemisch (1 mg/ml MTT) für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Extraktion des reduzierten MTT geschieht mit azidem Isopropanol, welcher die Zellen aufschließt und die gebildeten Formazankristalle freisetzt. Die farbmtrische Messung des im Gewebe umgesetzten Formazans wird bei OD_{570nm} durchgeführt. Aus den gemessenen OD's kann dann die prozentuale „Viabilität“ ermittelt werden.

Das kristalline Formazan präzipitiert in das zelluläre Zytosol wobei die Menge des Präzipitats quantitativ mit der allgemeinen zellulären Viabilität korreliert. Daher kann der MTT-Test als Indikator der „Vitalität oder Fitness“ eines Gewebes bezeichnet werden, weil zelluläre Prozesse der Respiration und der Energiegewinnung zur Reduktion des MTT führen. Nachdem die MTT-Reaktion gestoppt ist, wird das präzipitierte Formazan via chemischer Lyse vollständig aus den Geweben freigesetzt. Die optische Dichte (OD) der Formazanlösungen wird mittels farbmtrischer Messung ermittelt. Aus den optischen Dichten der Lösungen wird die „Vitalität“ in Prozent berechnet.

2.4.1 Viabilitätsmessungen via MTT- Viabilitäts-Assay

Vor dem eigentlichen Versuchsansatz wurde getestet ob die Testsubstanz **OrthoCell balance OH- Lösung** das MTT-Reagenz intrinsisch reduzieren kann (MTT-Reducer). Dazu wurden 30 µl der Testsubstanz zu 1 ml MTT-Mediumgemisch hinzugegeben, und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert (Referenz; nur MTT-Mediumgemisch). Dabei zeigte sich keinerlei Verfärbung der MTT-Lösung. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Testsubstanz das MTT intrinsisch reduzieren kann. Die Modelle wurden wie unter 2.2 angegeben mit der Testsubstanz beprobt und inkubiert. Nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die

Modelle mit sterilem PBS gewaschen und der Boden der Modellgefäße auf einem Tuch abgetupft, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Die Modelle wurden anschließend in eine neue 24 well Platte überführt. Jedes well der Platte beinhaltet 0,3 ml MTT-Assay-Medium Gemisch (1 mg/ml MTT). Die Modelle wurden dann für 3 h bei 37°C, 95 % H₂O, 5 % CO₂ in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Modellgefäße auf ein steriles Tuch überführt und für 10 – 15 Sekunden liegen gelassen, um überschüssiges Medium/MTT Gemisch zu entfernen. Anschließend wurden die Modelle in eine neue 24-well Platte überführt und mit 2 ml Isopropanol zur Formazanextraktion überschichtet. Um die Evaporation des Isopropanols zu minimieren, wurde die Platte mit Parafilm versiegelt und anschließend mit Aluminiumfolie ummantelt. Die Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht in Dunkelheit. Die optische Dichte aller Formazanextrakte wurde anschließend bei OD_{570nm} bestimmt.

Berechnungen:

Die optische Dichte der Negativkontrolle wird 100 % Vitalität gesetzt.

Die Vitalität der Positivkontrolle sowie der Testsubstanz berechnet sich nach:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{optische Dichte der Testsubstanz}}{\text{optische Dichte der Negativkontrolle}} * 100$$

*die optischen Dichten werden zuvor korrigiert indem man den Mittelwert der optischen Dichte des Isopropanols von der optischen Dichte der Testsubstanz, Positiv- und Negativkontrolle subtrahiert.

Literatur:

- [1] Hayden, P., *et al.*, (2011) „Use of normal Human 3D Tissue models (EpiDerm™, EpiAirway™) for Nanotoxicology Applications“, GTAM 2011, Newark, USA
- [2] Alepee, *et al.*, (2013) “In vitro EpiSkin corrosion as a reference test method in OECD TG431 for the assessment of skin corrosion in sub-categories 1A, 1B, 1C”, Society of Toxicology (SOT), Annual Meeting
- [3] Alepee, *et al.*, (2014) “Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin™ reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: revision of OECD Test Guideline 431”, *Toxicology in vitro* Mar;28(2);**131-45**
- [4] Berridge, M.V., *et al.* (1996) “The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts”. *Biochemica*. No.4: **14-19**

3. Studiendesign & Durchführung

Ziel der vorliegenden Analyse war es, das irritierende Potential des Produktes **OrthoCell balance OH- Lösung** anhand der OECD TG 439 (Irritation der Haut) Richtlinie an humanen 3D-Modellen (EpiDerm™) nach einmaliger, topischer Applikation zu untersuchen. Als Referenzwerte wurden 3 Modelle mit PBS behandelt. 5 % SLS wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Applikation aller Substanzen erfolgte im Triplikat (3 unabhängige Modelle). Alle Kontrollen und behandelte Modelle wurden parallel unter identischen Bedingungen kultiviert, präpariert und analysiert.

Tabelle1 : Studienaufbau und Durchführung (OECD TG 439)

Experimentelles Design der Studie OECD TG 439	
topische Applikation des zu testenden Produktes OrthoCell balance OH- Lösung	
Testsubstanz je 30 µl	Inkubationszeitraum [h] /Anzahl der verwendeten Modelle
	1 Stunde Inkubation + 42-stündige Postinkubation
PBS	3
OrthoCell balance OH- Lösung (unverdünnt)	3
OrthoCell balance OH- Lösung (1:5 Verdünnung in Wasser)	3
5 % SLS (wässrige Lösung)	3
Endpunkt	MTT-Viabilitäts-Test

4. Ergebnisse

4.1 MTT-Viabilitätstest (OECD TG 439)

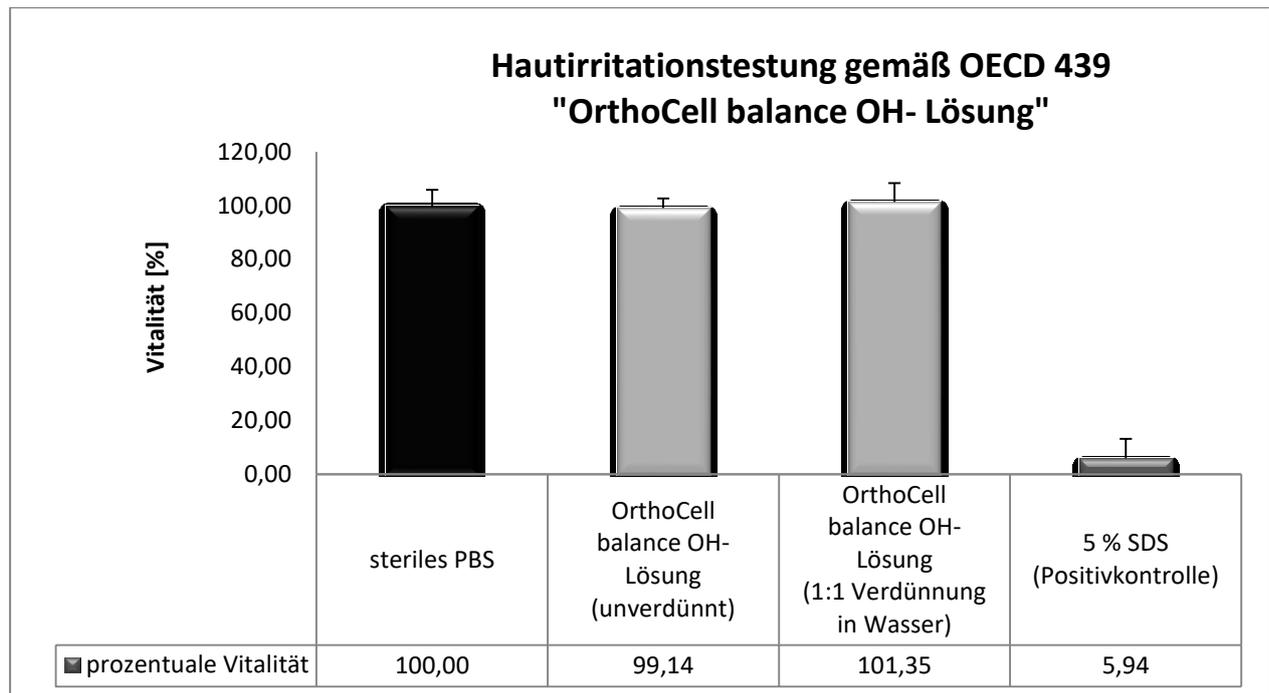


Abb. 3: Zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse des MTT-Viabilitätstests nach einer Stunde topischer Inkubation und anschließender 42-stündiger Postinkubation.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, lag die durchschnittliche Vitalität der Modelle, welche mit **OrthoCell balance OH- Lösung** inkubiert wurden bei 99,14 % (unverdünnt) und 101,35 % (1:5 verdünnt), verglichen mit sterilem PBS behandelten Modellen. Die Positivkontrolle zeigte eine Restvitalität von 5,94 %.

4.2 Akzeptanzkriterien:

Eine Irritationstestung mit EpiDerm™ 3D-Epidermismodellen wird als valide angesehen, falls:

- die absolute optische Dichte der Negativkontrolle (Behandlung mit deionisiertem Wasser) $\geq 1,0$ und $\leq 2,5$ bei 570nm im Mittel liegt. Der Mittelwert der Negativkontrolle lag bei 2,13 und somit innerhalb der Toleranzgrenze.
- der Viabilitätsmittelwert der Positivkontrolle (5 % SLS in H₂O) ≤ 20 % liegt. Da der Vitalitätswert der Positivkontrolle bei 5,94 % im Mittel lag, sind auch die Kriterien der Positivkontrolle eingehalten.
- Die Standardabweichung der drei produkt-behandelten 3D-Modelle ≤ 18 % liegt. Die Standardabweichungen lagen bei 3,56 % (unverdünnt) und 7,02 % (1:5 verdünnt) somit jeweils innerhalb der geforderten Toleranz.

Die durchgeführte Testung erfüllt alle Akzeptanzkriterien und kann folgerichtig als valide angesehen werden.

5. Vorhersagemodell & abschließende Bewertung

5.1 OECD TG 439 (Irritation der Haut)

Gemäß der Klassifizierung der EU und GHS (R38 / Kategorie 2 oder keine Kennzeichnungspflicht) wird eine Substanz als irritierend eingestuft, falls die durchschnittliche Gewebevitalität der drei unabhängig voneinander mit der Testsubstanz behandelten Modelle unter 50 % der Durchschnittsvitalität der Negativkontrollen liegt.

In vitro Ergebnis	In vivo Vorhersage
durchschnittliche Gewebevitalität \leq 50 %	Irritierend (R38 oder GHS Kategorie 2)
durchschnittliche Gewebevitalität $>$ 50 %	Nicht-irritierend (NI)

In der vorliegenden Studie lag die durchschnittliche Vitalität der Hautmodelle, welche mit dem Testprodukt inkubiert wurden $>$ 50 % für beide verwendeten Konzentrationen (99,14 % unverdünnt und 101,35 % 1:5 Verdünnung in Wasser). Somit ist das **OrthoCell balance OH-Lösung** als:

EU: Nicht-irritierend (NI); GHS: keine Kategorie, einzustufen.



Dr. med. Werner Voss
 Dermatology, Venerology,
 Allergology and environmental
 medicine

Dr. rer. nat. Lars Rüter
 Molecular & cell biologist

Dr. med. Gerrit Schlippe
 Dermatology, Venerology