

Reconstituted human epidermal, corneal and oral epithelial tissue models : alternatives to animal test models for the pre-clinical evaluation and risk assessment of topical products

Citation for published version (APA):

de Wever, B. (2006). *Reconstituted human epidermal, corneal and oral epithelial tissue models : alternatives to animal test models for the pre-clinical evaluation and risk assessment of topical products.*

Document status and date:

Published: 01/01/2006

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 09 May. 2021

General discussion

Chapter 1 reviews the morphological (ultra structural) and biochemical (differentiation marker expression, lipid analysis and gene expression) characteristics of *in vitro* reconstructed human epidermis reconstituted, obtained by cultivating primary human keratinocytes on inert polycarbonate filters for 17 days at the air-liquid interface in chemically defined medium. An optimised testing strategy called Multiple Endpoint Analysis or MEA is proposed for the evaluation of the biocompatibility of test compounds in general. The MEA strategy is based on the assessment of tissue viability, tissue morphology and the release of pro-inflammatory mediators after topical application of any given test compound for a specific time period. Too often only tissue viability (assessed by means of the MTT assay) is being used as a single toxicological endpoint to assess toxic effects: this can lead to false negative results since MTT is primarily converted by the basal and supra-basal cells of *in vitro* reconstructed tissue constructs: any superficial toxicity in the upper layers of these tissues is not detected by MTT testing, hence the MEA strategy proves to be crucial for the testing of milder products such as pharmaceutical skin care formulations. In Chapter 2 the gene expression profiles of human skin, cultured keratinocytes and reconstructed human epidermis were compared using large DNA micro-arrays. The results of this study show skin *in vivo* and reconstructed human epidermis are very similar in most respects, except that skin expresses more secreted proteins and cell surface receptors reflecting its more complex cellular environment. Also, the metabolism rate of human skin *in vivo* seems less than that in *in vitro* reconstructed human epidermis. Nevertheless, a high overall correlation is found in most respects, opposite to the gene expression profile of cultured monolayer keratinocytes that lack differentiation and hence do not express epidermal differentiation markers, indicating the usefulness of reconstructed epidermis as a scientifically relevant tool for skin toxicology testing. Chapter 3 describes the utility of reconstructed epidermis for the assessment of skin irritation and sensitization. Using MEA, in this case the dose related tissue viability, in combination with the release of pro-inflammatory mediators IL-1 α and IL-8, it was possible to discriminate and classify, in a single assay, irritating and sensitizing test compounds. Although reconstructed epidermis features many of the characteristics of human skin *in vivo*, it is composed only of keratinocytes. Other cell types such as Langerhans cells as well as blood-derived leukocytes, which play a crucial role in cutaneous immune response *in vivo*, are absent. Nevertheless, keratinocytes are the predominant cell type of human epidermis and are the first cell type with which test compounds are in contact during the initial stages of irritation and/or sensitization. Since only a very limited set of well defined skin irritants and sensitizers were evaluated, additional testing needs to be performed to demonstrate that this approach can be used to classify other types of skin irritating/sensitizing compounds. Chapter 4 deals with the assessment of the SkinEthic *in vitro* reconstructed human epidermis model for *in vitro* skin corrosion testing, in accordance to the new OECD Guideline TG431. This OECD Guideline already endorsed the use of *in vitro* skin model systems for *in vitro* corrosion testing; hence the principle of 'catch-up' validation was applied to assess the SkinEthic reconstructed epidermis model. In a first phase, the test method was optimised and consequently, a set of 12 reference chemicals, specified in the OECD Test Guideline were tested in 3 independent runs in 4 laboratories. Results obtained with the SkinEthic skin model were reproducible,

both within laboratories and over time. Concordance between laboratories and the predictions obtained with other accepted OECD tests was also very good, since the SkinEthic skin model was able to distinguish corrosive from non-corrosive chemicals for all 12 tested OECD reference chemicals. Consequently, the assay can now be used as regulatory accepted alternative method for skin corrosion testing. Chapter 5 describes an *in vitro* reconstructed model of corneal epithelium by using immortalized corneal cells that are cultivated for 7 days at the air liquid interface which will eventually form a 3D differentiated epithelium that mimics the ultra structural and biochemical properties of human cornea *in vivo*. Hemidesmosomes are abundantly present along the basal membrane of the basal cells in the *in vitro* construct. Also the expression of Keratin-3, a cornea-specific differentiation marker was found. When the corneal construct was exposed to benzalkonium chloride, a dose dependent toxicity was observed, both by increased loss in epithelial viability and structure but also by induction of MAPK, a cellular stress response enzyme, indicating the potential applicability of this *in vitro* model as replacement for the animal Draize rabbit eye irritation test. Indeed, in Chapter 7, the successful pre-validation of this corneal model for eye irritation testing is reported (see below). In Chapter 6, an *in vitro* model for corneal wound healing was assessed based on the expression of EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) to assess its role in epithelial- stromal interactions that occur during impaired corneal healing. The expression of EMMPRIN in the *in vitro* corneal construct demonstrated a similar gradient to the one observed in central cornea *in vivo*. This observation further substantiates the physiological features of *in vitro* 3D model. In Chapter 7 the pre-validation of the *in vitro* 3D corneal epithelial model to assess the eye irritation potential of chemicals is described. In a multi-centre study approach, 20 coded reference chemicals, covering the whole range of eye irritancy, were evaluated by topical exposure to the cultures for 10 minutes. Once a standardized protocol was established, a high level of reproducibility between the 4 participating laboratories was observed. Based on a tissue viability cut-off of 60%, a Prediction Model allowing differentiation between irritants and non-irritants was established. The *in vitro* 3D corneal model demonstrated an 80% overall concordance with published *in vivo* Draize eye irritation data. Although the sensitivity of the assay was 100%, the specificity was only 56%. However the predictive power of the *in vitro* corneal model increased substantially when other sources of *in vivo* and *in vitro* data were taken into account, indicating that the quality of the available Draize rabbit eye irritation data for some chemicals is questionable. A report of this pre-validation study is currently being evaluated by ECVAM (European Validation of Alternative Methods) for eventual full validation. In Chapter 8, the characterization of 2 recently developed 3D human constructs, human oral and gingival epithelium, is described. Using immortalized oral and primary gingival epithelial cells, airlifted cultivation in chemically defined medium for 7 days results in 3D constructs of oral and gingival epithelium respectively. A histological comparison, both using light and electron microscopy, was made using *in vivo* biopsy material. Both *in vitro* 3D tissue models demonstrated a high resemblance with normal *in vivo* oral lingual and gingival attached epithelium. In chapter 9, the oral and gingival tissue models were evaluated to assess the potential toxicity of toothpaste formulations after topical application. 5 different commercially available toothpastes (some of them containing SLS) were tested at a 30% dilution and exposed to both oral and gingival epithelial cultures for 10 minutes, 1 hour and 3 hours. Multiple Endpoint Analysis MEA (tissue viability, tissue morphology and the release of pro-inflammatory mediator IL-1a) was

assessed for each toothpaste. Both tissue models, although oral mucosa being more sensitive due to a less differentiated ultra-structure as compared to gingival epithelium) clearly demonstrated the toxic effect of SLS containing toothpastes. These in vitro observations confirm previous reports on SLS oral toxicity in clinical literature. Further studies are needed to validate the predictive value of both models and experimental protocols as alternative to animal methods for the risk assessment of oral care formulations.

Recent advances in tissue engineering allow today the reconstruction of a variety of human tissue models in large quantities and with high reproducibility. Both skin models (simple epidermal and more complex dermal-epidermal models), corneal constructs, oral and gingival mucosa models, vaginal, oesophageal, lung and others provide toxicologists reliable tools to develop relevant alternative methods to assess the toxicity of chemicals in stead of using animals. The present thesis work demonstrates that these in vitro models provide very valuable tools, especially to address the topical toxicity tests including skin irritation, eye and mucosal irritation, phototoxicity and corrosion. However in vitro assays to replace animal testing for sensitisation, chronic toxicity, and tissue recovery after eye injury remain challenges to be addressed: further R&D using these in vitro 3D human models is currently ongoing.

Samenvatting

Hoofdstuk 1 beschrijft de morfologische (ultrastructuur) en biochemische (differentiatie merkers, lipidenanalyse en genexpressie) karakterisatie van in vitro gereconstrueerd humaan epidermis, dat wordt verkregen door cultivatie van humane primaire keratinocyten op inerte polycarbonaat filters aan de lucht-water interface in chemisch gedefinieerd cultuur medium. Een geoptimaliseerde in vitro teststrategie, Multiple Endpoint Analyse of MEA genoemd, wordt voorgesteld om de biocompatibiliteit van testmaterialen te evalueren. De MEA strategie is gebaseerd op het bepalen van de weefselleefbaarheid (gemeten met behulp van de MTT assay), het analyseren van de weefselstructuur en de kwantificatie van de vrijstelling van pro-inflammatoire mediators na topische aanbrengen van de te testen stof voor een vastgestelde periode. Helaas wordt maar al te dikwijls enkel de MTT test gebruikt als enige eindpunt om de toxiciteit te bepalen: dit kan leiden tot valse negatieve resultaten aangezien MTT hoofdzakelijk wordt gemetaboliseerd door de basale en suprabasale cellen in de in vitro gereconstrueerde weefsels: elke superficiële toxiciteit (ttz ter hoogte van de bovenste cellagen van het 3D construct wordt niet gedetecteerd door de MTT assay. Om deze reden bewijst de MEA strategie haar doeltreffendheid voor de toxiciteitsmeting van mildere stoffen zoals farmaceutische skin care producten. In hoofdstuk 2 werd het genexpressie profiel van humane huid vergeleken met dat van in vitro gereconstrueerd humaan epidermis en van primaire humane keratinocyten, gekweekt als monolayer culturen. De resultaten van deze studie tonen aan dat humane huid in vivo en gereconstrueerd humaan epidermis in het algemeen goed vergelijkbaar zijn, hoewel in de huid in vivo meer proteïnen en cellulaire receptoren worden tot expressie gebracht, in overeenstemming met de grotere cellulaire complexiteit van de huid in vivo. Niettegenstaande bestaat er een grote correlatie tussen in vivo huid en in vitro epidermis, in tegenstelling tot het gen expressie profiel van niet gedifferentieerde monolayer keratinocyten culturen waar een volledige afwezigheid van differentiatie merkers werd vast gesteld. Hoofdstuk 3 beschrijft het gebruik van in vitro gereconstrueerd epidermis voor het bepalen van het irritatie en sensitizatie potentiaal van chemisch stoffen. Gebruikmakend van de MEA analyse, in dit geval door het meten van de dosisafhankelijke weefsel viabiliteit, in combinatie met de vrijstelling van de pro-inflammatoire mediators IL-1 α en IL-8, was het mogelijk om de irriterende stoffen van de sensitizerende te onderscheiden in één en dezelfde test. Hoewel in vitro gereconstrueerde epidermis op verschillende vlakken overeenkomsten vertoont met humane epidermis in vivo, bestaat in vitro gereconstrueerde epidermis uitsluitend uit keratinocyten: andere celtypes zoals Langerhans cellen en uit het bloed afkomstige leukocyten, welke een cruciale rol spelen in de immunorespons van de huid, zijn in dit in vitro model niet aanwezig. Niettegenstaande zijn de keratinocyten het dominante celtype in humane epidermis in vivo: zodra een chemische stof met de huid in contact komt zijn de keratinocyten de allereerste cellen die worden geactiveerd en die dus een determinerende rol spelen in het irritatie en/of sensitizatie reactieproces. Aangezien enkel maar een zeer beperkt aantal irriterende en sensitizerende stoffen werd getest, moet worden nagegaan of deze in vitro benadering kan worden uitgebreid tot andere types van huidirriterende en sensitizerende chemicaliën. Hoofdstuk 4 behandelt de evaluatie van het humaan in vitro epidermis model voor in vitro corrosiviteitstesting, in overeenkomst met de OECD testrichtlijn TG431. Deze testrichtlijn beveelt het gebruik van in vitro huidmodellen voor de bepaling van het

corrosief karakter van chemische stoffen aan. Bij gevolg werd het principe van 'Catch-up' validatie toegepast om het in vitro epidermis model te valideren. Eerst werd het test protocol geoptimaliseerd en vervolgens werden 12 referentiestoffen, gespecificeerd in de OECD richtlijn, getest in 3 afzonderlijke experimenten door 4 laboratoria. De resultaten verkregen met het in vitro huidmodel bleken reproduceerbaar, zowel tussen de test laboratoria als in de tijd (ie over de 3 afzonderlijke experimenten). Ook de overeenstemming tussen de labo's als tevens met eerder gepubliceerde OECD test methodes was zeer goed, aangezien door middel van dit in vitro huidmodel alle 12 referentiestoffen juist werden geclassificeerd als corrosief of niet-corrosief. Hoofdstuk 5 beschrijft een in vitro gereconstrueerd model van humaan cornea epitheel. Dit in vitro 3D weefsel wordt verkregen door geïmmortaliseerde cornea epitheelcellen te kweken op polycarbonaat filters gedurende 7 dagen (air-liquide interface) welke aldus een 3D epitheel vormen dat grote gelijkens vertoont, zowel ultrastructureel als biochemisch, met humaan corneaweefsel in vivo. Zowel de aanwezigheid van hemidesmosomen ter hoogte van het basale membraan als de expressie van de differentiatie marker cytokeratin 3, een cornea specifiek eiwit, tonen dit aan. Wanneer dit 3D cornea model werd blootgesteld aan benzalkonium chloride, kon een dosisafhankelijke toxiciteit worden aangetoond door middel van de geïnduceerde verlaagde epitheliale viabiliteit en veranderde weefselmorfologie, maar ook door de inductie van MAPK (een cellulair stress response enzym), wat laat besluiten dat dit 3D in vitro model als potentieel alternatief zou kunnen worden aangewend ter vervanging van de konijnen Draize oogirritatie test. Inderdaad, in hoofdstuk 7 wordt de succesvolle prevalidatie van dit cornea model voor het bepalen van het oogirritatie potentiaal van chemische stoffen beschreven (zie verder). In Hoofdstuk 6 wordt het gebruik van het in vitro 3D cornea model voor corneaal wondhelingonderzoek beschreven, gebaseerd op de expressie van EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), dat de vrijstelling van MMP's (metalloproteinases) induceert. De expressie van EMMPRIN in het in vitro 3D cornea model vertoont een gelijkaardige gradiënt als die wordt terug gevonden in het centrale deel van de cornea in vivo. Deze observaties ondersteunen verder het feit dat dit in vitro 3D cornea model fysiologische in vivo eigenschappen bezit. In hoofdstuk 7 wordt de pre-validatie van het 3D in vitro cornea model voor het testen van de oogirriterende eigenschappen van chemische stoffen beschreven. In een multi-center studie werden 20 gecodeerde referentiestoffen, die het ganze spectrum van oogirritatie omvatten, geëvalueerd door topische applicatie op de cornea weefsels gedurende 10 minuten. Vanzodra een gestandaardiseerd testprotocol werd gedefinieerd, werd een hoge reproduceerbaarheid van de test resultaten tussen de 4 participerende laboratoria bekomen. Gebaseerd op een weefselleefbaarheid cut-off waarde van 60%, werd een predictiemodel bepaald dat een classificatie van de stoffen als irriterend of als niet-irriterend toeliet. Het 3D in vitro cornea model vertoont een gemiddelde in vivo-in vitro overeenkomst van 80% met de gepubliceerde Draize konijnen oogirritatie gegevens. Hoewel de sensitiviteit van de assay 100% is, bleek de specificiteit maar 56% te zijn. Wanneer nochtans andere bronnen van in vivo en in vitro toxiciteit data mede in beschouwing werden genomen, verhoogde de predictive 'power' van het model aanzienlijk, wat er op wijst dat de beschikbare (gepubliceerde) Draize konijnen oogirritatie data voor sommige test stoffen in twijfel kunnen worden getrokken. Een rapport van deze pre-validatiestudie ligt ter discussie bij ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods), om de volwaardige validatie van dit model verder te organiseren.

In Hoofdstuk 8 wordt de karakterisatie van 2 recenter ontwikkelde 3D humane constructen, tzt oraal en gingiva epitheel, beschreven. Door gebruik te maken van geïmmortaliseerde orale epitheelcellen enerzijds en primaire gingivale epitheelcellen anderzijds, kunnen na 7 dagen van air-liquid interface cultivatie op polycarbonaat filters, driedimensionale culturen van respectievelijk oraal en gingivaal epitheel bekomen worden. Een histologische vergelijking, gebruik makende van licht –en electronenmicroscopie werd uitgevoerd en vergeleken met humaan biopsie materiaal. Beide in vitro 3D culturen vertonen grote gelijkenis met normaal in vivo oral-linguaal en gingivaal weefsel. In Hoofdstuk 9 tenslotte worden deze orale in vitro culturen geëvalueerd om het toxiciteitspotentiaal van tandpasta's te testen. 5 verschillende commercieel verkrijgbare tandpasta's (waarvan enkele SLS bevatten) werden verdund tot 30% en vervolgens topicaal aangebracht op in vitro oraal en gingivaal epitheel gedurende 10 minuten, 1 uur en 3 uur. Multiple End Point MEA analyse (weefselleefbaarheid, morfologie en de vrijstelling van interleukine-1alpha) werd vervolgens uitgevoerd voor elke tandpasta. Beide in vitro modellen (oraal mucosa in sterkere mate, daar dit model minder gedifferentieerd is dan gingiva epitheel) tonen de toxische effecten van SLS bevattende tandpasta's aan. Deze in vitro observaties bevestigen eerder gepubliceerde klinische toxiciteitsgegevens. Bijkomstige studies zijn uiteraard noodzakelijk om de predictiviteit van deze modellen en experimentele protocols te valideren zodat deze test approach kan worden aangewend als alternatieve testmethode voor de risico-toxiciteitsmetingen van oral care producten.

De recente wetenschappelijke vooruitgang in de weefselcultuurmethodiek laat heden ten dage toe om verschillende humane weefselmodellen te reconstrueren in grote hoeveelheden, en met intrinsieke hoge reproduceerbaarheid. Zowel huidmodellen (eenvoudige epidermale als ook complexe dermale-epidermale modellen), cornea constructen, orale en gingivale epitheelculturen, vaginale, oesofagale, long en andere 3D culturen kunnen door toxicologen worden aangewend om relevante alternatieve methoden voor toxiciteitstesten te ontwikkelen in plaats van gebruik te maken van proefdieren. Dit proefschrift toont duidelijk aan dat deze modellen als volwaardige testsystemen kunnen worden gebruikt, in het bijzonder om de irritatiegraad, fototoxiciteit en corrosiviteit te meten. Toch zijn een aantal testen waaronder bv. allergie, chronische toxiciteit, weefsel 'recovery' na oogirritatie, nog niet volledig door alternatieve methoden te vervangen. Verder onderzoek mede gebruikmakend van deze 3D in vitro culturen is aan de gang om ook voor deze complexere toxiciteitstesten volwaardige alternatieve methoden op punt te stellen.