

## ALLEGATO "E"

### ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO IN VITRO



## B.45. ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO IN VITRO

## 1. METODO

Il metodo di seguito descritto corrisponde alle linee guida dell'OCSE TG 428 (2004).

## 1.1. INTRODUZIONE

Questo metodo è stato elaborato per ottenere informazioni sull'assorbimento di una sostanza di prova applicata su un campione di pelle asportata. Può essere associato al metodo di assorbimento cutaneo *in vivo* (1), o essere eseguito da solo. Si raccomanda di consultare il documento orientativo dell'OCSE sullo svolgimento di studi concernenti l'assorbimento cutaneo [OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2)] per l'elaborazione di studi che si basano su questo metodo. Tale documento è stato elaborato per agevolare la selezione di procedure *in vitro* adeguate, da utilizzare in circostanze specifiche al fine di garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti con tale metodo.

I metodi per la misurazione dell'assorbimento cutaneo e della diffusione cutanea possono essere divisi in due categorie: *in vivo* e *in vitro*. I metodi *in vivo* per la valutazione dell'assorbimento cutaneo sono di uso comune e forniscono informazioni di carattere farmacocinetico per una serie di specie animali. In un altro metodo di prova (1) viene descritto un metodo *in vivo*. I metodi *in vitro* sono anche utilizzati da molti anni per misurare l'assorbimento cutaneo. Sebbene non siano stati eseguiti studi di validazione ufficiale dei metodi *in vitro* di cui al presente metodo, gli esperti dell'OCSE hanno convenuto nel 1999 che esistevano dati sufficienti a sostegno del metodo *in vitro* (3). Ulteriori informazioni in questo senso, in particolare un numero importante di confronti diretti tra i metodi *in vitro* e *in vivo*, sono contenuti nel documento orientativo (2). Varie monografie trattano questo tema e forniscono informazioni dettagliate sull'uso del metodo *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). I metodi *in vitro* misurano la diffusione di sostanze chimiche nella pelle e attraverso la pelle verso un serbatoio di fluidi e possono servirsi di campioni di pelle non vitale per misurare unicamente la diffusione, o campioni di pelle appena asportati e che evidenziano un'attività metabolica, per misurare contemporaneamente la diffusione e il metabolismo cutaneo. Questi metodi sono utilizzati, in particolare, per confrontare la somministrazione cutanea e transcutanea di varie formulazioni di sostanze chimiche e possono fornire modelli utili per la valutazione dell'assorbimento transcutaneo nell'essere umano.

Tale metodo *in vitro* potrebbe non essere applicabile in tutte le situazioni e a tutte le classi di sostanze chimiche. Può essere utilizzato per una valutazione qualitativa iniziale della penetrazione cutanea. In alcuni casi potrebbe essere necessario completare detta valutazione con dati *in vivo*. È opportuno consultare il documento orientativo (2) per l'individuazione di altre situazioni in cui l'uso del metodo *in vitro* può rivelarsi opportuno. I riferimenti bibliografici (3) contengono informazioni dettagliate complementari che risulteranno utili ai fini della scelta del metodo.

Questo documento presenta i principi generali per la misura dell'assorbimento e della diffusione cutanee della sostanza di prova utilizzando pelle asportata. Si possono utilizzare campioni di pelle di molte specie di mammiferi diversi, esseri umani compresi. Le proprietà di permeabilità della pelle sono mantenute dopo l'asportazione dal corpo in quanto la principale barriera di diffusione è lo strato corneo non vitale; non è stato rilevato alcun trasporto transcutaneo attivo di sostanze chimiche. La pelle ha evidenziato la capacità di metabolizzare alcune sostanze chimiche durante l'assorbimento transcutaneo (6), ma questo processo non è limitativo della velocità in termini di dosi effettivamente assorbite, sebbene possa condizionare la natura del materiale che entra nella circolazione sanguigna.

## 1.2. DEFINIZIONI

**Dose non assorbita:** la dose presente nell'acqua di risciacquo dell'epidermide dopo l'esposizione e sulla copertura non occlusiva, ivi comprese le dosi che evaporano dalla pelle durante l'esposizione.

**Dosa assorbita (in vitro):** massa della sostanza di prova che raggiunge il fluido recettore o la circolazione sistemica entro un determinato periodo.

**Dose assorbibile (in vitro):** dose presente sulla o nella pelle dopo il lavaggio.

## 1.3. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza di prova, che può essere radiomarcata, viene applicata sulla superficie di un campione di pelle che separa le due camere di una cella di diffusione. La sostanza chimica viene lasciata sulla pelle per un periodo determinato in condizioni specifiche prima di essere eliminata con un'adeguata procedura di pulizia. Il fluido recettore è campionato in vari momenti durante l'esperimento e analizzato per stabilire la presenza della sostanza di prova e/o di metaboliti.

Qualora vengano utilizzati sistemi metabolicamente attivi, i metaboliti della sostanza di prova possono essere analizzati ricorrendo a metodi adeguati. Alla fine dell'esperimento, la distribuzione della sostanza di prova e i suoi metaboliti sono quantificati, se opportuno.

Nelle condizioni adeguate, descritte nel presente metodo e nel documento orientativo (2), l'assorbimento di una sostanza di prova in un periodo determinato viene misurata analizzando il fluido recettore e il campione di pelle trattato. La sostanza di prova che rimane nella pelle deve essere considerata assorbita, a meno che non si riesca a dimostrare che l'assorbimento può essere determinato anche solo dai valori del fluido recettore. L'analisi degli altri componenti (materiale eliminato dalla pelle mediante risciacquo che rimane negli strati cutanei) consente di procedere a ulteriori valutazioni dei dati, quali l'eliminazione totale della sostanza di prova e la percentuale di recupero.

Al fine di dimostrare le prestazioni e l'affidabilità del sistema nel laboratorio che esegue la prova, sarebbe opportuno disporre dei risultati ottenuti con dei prodotti chimici di riferimento pertinenti, conformemente alla letteratura pubblicata sul metodo in questione. Questo requisito potrebbe essere soddisfatto testando una sostanza di riferimento adeguata (di preferenza una sostanza con affinità per ambienti lipidici simili alla sostanza di prova) contemporaneamente alla sostanza di prova o fornendo dati storici pertinenti per una serie di sostanze di riferimento con affinità per ambienti lipidici diversi (ad esempio, caffeina, acido benzoico e testosterone).

#### 1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

##### 1.4.1 Cella di diffusione

Una cella di diffusione è costituita da una camera «donatrice» e una camera «recettrice» in mezzo alle quali viene posto il campione di pelle (alla fig. 1 è riportato un modello standard). La cella di diffusione deve avere una buona tenuta intorno alla pelle, consentire un agevole campionamento e un'adeguata miscela della soluzione recettrice in contatto con la faccia inferiore della pelle, permettere un controllo adeguato della temperatura della cella e del suo contenuto. Si possono utilizzare celle di diffusione statiche e a flusso (*flow-through*). Di norma le camere donatrici sono lasciate aperte al momento dell'esposizione ad una dose finita di un preparato di prova. Tuttavia, per applicazioni infinite e in alcuni casi di dosaggi finiti, le camere donatrici possono essere chiuse.

##### 1.4.2. Fluido recettore

Si utilizzerà di preferenza un fluido recettore fisiologicamente adeguato, anche se è consentito l'uso di altri fluidi qualora il loro uso sia giustificato. Occorrerà fornire la composizione esatta del fluido recettore. Occorrerà dimostrare l'adeguata solubilità della sostanza di prova nel fluido recettore in modo che quest'ultimo non ostacoli l'assorbimento. Inoltre, il fluido recettore non deve intaccare l'integrità del campione di pelle. In un sistema a flusso la velocità di flusso non deve ostacolare la diffusione della sostanza di prova nel fluido recettore. In un sistema a cella statica, il fluido dovrebbe essere continuamente agitato e regolarmente campionato. Per lo studio del metabolismo il fluido recettore deve consentire la vitalità del campione di pelle per l'intera durata dell'esperimento.

##### 1.4.3 Preparati di pelle

Potranno essere utilizzati campioni di pelle di origine umana e animale. È noto che l'utilizzo di pelle umana è oggetto di considerazioni etiche e soggetto a condizioni nazionali ed internazionali. Di preferenza si utilizzeranno campioni di pelle vitale, ma l'uso di campioni non vitali è consentito a condizione di poter dimostrare l'integrità della pelle. Possono essere utilizzate membrane epidermiche (separate mediante processi enzimatici, termici o chimici) o campioni di pelle di spessore parziale (di solito tra 200 e 400  $\mu\text{m}$ ) preparati con un dermatomo. I campioni di pelle a spessore totale sono consentiti, ma dovrebbero essere evitati spessori eccessivi (superiori a circa 1 mm), a meno che non siano specificatamente richiesti per determinare la sostanza chimica di prova negli strati epidermici. Occorre giustificare la scelta della specie, del sito anatomico e della tecnica di preparazione. Sono richiesti dati accettabili risultanti da almeno quattro repliche per preparato di prova.

##### 1.4.4 Integrità del preparato

Il campione di pelle deve essere adeguatamente preparato. Eventuali manipolazioni inadeguate possono danneggiare lo strato corneo, pertanto è opportuno verificare l'integrità della pelle preparata. Per lo studio del metabolismo la pelle appena asportata dovrebbe essere utilizzata il più rapidamente possibile e in condizioni che consentano di mantenere l'attività metabolica. A titolo orientativo, la pelle appena asportata dovrebbe essere utilizzata nell'arco di 24 ore, ma il periodo di conservazione consentito potrebbe variare in funzione del sistema enzimatico che interviene nella metabolizzazione e delle temperature di stoccaggio (13). Qualora i campioni di pelle siano stati conservati prima dell'utilizzazione, occorrerebbe dimostrare che la funzione di barriera è stata mantenuta.

##### 1.4.5 Sostanza di prova

La sostanza di prova è il prodotto di cui si intende studiare le caratteristiche di penetrazione. Preferibilmente detta sostanza sarà radiomarcata.

##### 1.4.6 Preparazione della sostanza di prova

La preparazione della sostanza di prova (ad esempio, materiale puro, diluito o formulato contenente la sostanza di prova applicata sulla pelle) dovrebbe essere identica (o un sostituto adeguato) a quella cui gli esseri umani o le altre specie potenzialmente interessate possono essere esposti. Qualsiasi variazione dalla preparazione d'uso deve essere giustificata.

#### 1.4.7 **Concentrazioni e formulazioni delle sostanze di prova**

In linea di massima si utilizzano più concentrazioni della sostanza di prova in modo da coprire i valori più elevati della potenziale esposizione umana. Analogamente, si potrebbero *analizzare* una serie di formulazioni tipo.

#### 1.4.8 **Applicazione sulla pelle**

Nelle condizioni normali di esposizione umana alle sostanze chimiche, in linea di massima si riscontrano dosi finite. Sarà pertanto opportuno utilizzare un'applicazione che imiti le condizioni dell'esposizione umana, di solito pari a 1-5 mg/cm<sup>2</sup> di pelle per un solido e 10 µl/cm<sup>2</sup> per i liquidi. La quantità dovrebbe dipendere dalle condizioni di utilizzo previste, dagli obiettivi del saggio e dalle caratteristiche fisiche del preparato di prova. Ad esempio, le applicazioni sull'epidermide possono essere infinite dove si applicano importanti volumi per unità di superficie.

#### 1.4.9 **Temperatura**

La temperatura condiziona la diffusione passiva delle sostanze chimiche (e pertanto il loro assorbimento cutaneo). La cella di diffusione e la pelle devono essere mantenute ad una temperatura costante vicina alla temperatura normale della pelle (32 ± 1 °C). I vari modelli di cella richiederanno temperature diverse per il bagnomaria e il blocco riscaldante in modo da garantire il rispetto della norma fisiologica del recettore/della pelle. L'umidità sarà preferibilmente compresa tra 30 e 70 %.

#### 1.4.10 **Durata dell'esposizione e del campionamento**

Il campione di pelle può essere esposto al preparato di prova per l'intera durata del saggio o per periodi più brevi (ad esempio per simulare un tipo specifico di esposizione). Il lavaggio della pelle per eliminare l'eccesso di sostanza di prova deve essere eseguito con un agente di pulizia adeguato e l'acqua di risciacquo deve essere raccolta per essere analizzata. La procedura di eliminazione del preparato di prova dipenderà delle condizioni di uso previste e deve essere giustificata. Di norma è necessario un periodo di campionamento di 24 ore per ottenere l'adeguata caratterizzazione del profilo di assorbimento. Dal momento che l'integrità della pelle può cominciare a deteriorarsi dopo 24 ore, i periodi di campionamento non dovrebbero mai superare le 24 ore. Per le sostanze di prova che penetrano rapidamente nella pelle, il problema non si pone, ma per quelle che penetrano più lentamente possono essere necessari tempi più lunghi. La frequenza di campionamento del fluido recettore dovrebbe consentire di procedere alla rappresentazione grafica del profilo di assorbimento della sostanza di prova.

#### 1.4.11 **Procedure finali**

Tutti i componenti del sistema di prova devono essere analizzati ed occorre determinare il tasso di recupero. Ciò riguarda la camera donatrice, l'acqua di risciacquo dell'epidermide, il preparato di pelle, il fluido recettore o la camera recettrice. In alcuni casi la pelle può essere frazionata nell'area esposta della pelle e nell'area della pelle sotto il bordo della cella e in frazioni di strato corneo, epidermide e derma per eseguire analisi separate.

#### 1.4.12 **Analisi**

In tutti gli studi si dovrebbe ottenere un tasso di recupero sufficiente (l'obiettivo deve essere una media di 100 ± 10 % della radioattività, gli eventuali scartamenti da questi valori devono essere giustificati). La quantità di sostanza di prova nel fluido recettore, nel preparato di pelle, nelle acque di lavaggio dell'epidermide e nell'acqua di risciacquo dell'apparecchio devono essere analizzate con una tecnica adeguata.

## 2. **DATI**

Occorre fornire l'analisi del fluido recettore, la distribuzione della sostanza di prova nel sistema e il profilo d'assorbimento nel corso del tempo. In condizioni di esposizione a dosi finite, è necessario calcolare la quantità eliminata dalla pelle con il risciacquo, la quantità assimilata dalla pelle (e dai vari strati cutanei, se sono analizzati) e la quantità presente nel fluido recettore (tasso, quantità o percentuale della dose applicata). L'assorbimento cutaneo può a volte essere espresso unicamente utilizzando i dati relativi al fluido recettore. Tuttavia, quando la sostanza di prova rimane nella pelle alla fine dello studio, può essere necessario includerla nella quantità totale assorbita [cfr. paragrafo 66 nel riferimento bibliografico (3)]. In condizioni di esposizione a dosi infinite, i dati possono consentire di calcolare una costante di permeabilità (Kp). In tal caso, la percentuale assorbita è irrilevante.

### 3. RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO

#### 3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere i requisiti stabiliti nel protocollo, in particolare la giustificazione del sistema utilizzato, nonché le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

- natura fisica, proprietà fisicochimiche (almeno il peso molecolare e il coefficiente di ripartizione -  $\log P_{ow}$ ), purezza (purezza radiochimica);
- dati di identificazione (ad es. numero del lotto);
- solubilità nel fluido recettore.

Preparazione della sostanza di prova:

- formulazione e giustificazione dell'utilizzo;
- omogeneità.

Condizioni di prova:

- origini e sito della pelle, metodo di preparazione, condizioni di stoccaggio prima dell'uso, eventuali pretrattamenti (pulizia, trattamenti antibiotici ecc.), misure dell'integrità della pelle, stato metabolico, giustificazione dell'uso;
- modello di cella, composizione del fluido recettore, velocità di flusso del fluido recettore o intervalli e procedure di campionamento;
- informazioni sull'applicazione del preparato di prova e quantificazione della dose applicata;
- durata dell'esposizione;
- informazioni sull'eliminazione del preparato di prova dalla pelle (ad es. risciacquo della pelle);
- informazioni sull'analisi della pelle e le tecniche di frazionamento eventualmente utilizzate per dimostrare la distribuzione cutanea;
- procedure di lavaggio della cella e dell'apparecchiatura;
- metodi di saggio, tecniche di estrazione, limiti di rilevazione e validazione del metodo analitico.

Risultati:

- recuperi totali del saggio (dose applicata = liquido di lavaggio della pelle + pelle + fluido recettore + liquido di lavaggio della cella);
- tabella dei tassi di recupero in ciascun compartimento della cella;
- profilo di assorbimento;
- tabella dei valori di assorbimento (espressi sotto forma di tasso, quantità o percentuale).

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

**4. BIBLIOGRAFIA**

1. Metodo B.44. Assorbimento cutaneo: metodo *in vivo*.
2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OCSE, Parigi.
3. OCSE (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OCSE, Parigi.
4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
5. Bronaugh RL and Collier, SW.(1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pagg. 237-241.
6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monografia n. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Bruxelles.
8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191-205.
9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basilea.
12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York..
13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. *Arch Toxicol* 74: 356-365.

Figura 1

**Esempio di un modello tipo di cella di diffusione statica concepita per studiare l'assorbimento transcutaneo *in vitro***