

MASTEROPPGAVE

studieprogram

Mai. 2019

Betydning av intakt og skadet hudbarriere for opptak av kjemikalier
fra kosmetikk og kroppspeleieprodukter

Kvalitativ og kvantitativ

**Franz diffusjonscellesystem til opptak av kjemikalier på intakt, teipstrippet og rispet hud.
Risikovurdering av kjemikalier på både intakt og skadet hud.**

Rula Altaha



OsloMet – storbyuniversitetet

Fakultet for helsevitenskap

Folkehelseinstituttet

Masterstudium i biomedisin

Masteroppgave, 60 studiepoeng

Fakultet for Helsevitenskap, Institutt for naturvitenskapelige helsefag

- **Tittel på oppgaven:** Betydning av intakt og skadet hudbarriere for opptak av kjemikalier fra kosmetikk og kroppspfleieprodukter
- **Navn på kandidaten:** Rula Altaha
- **Utført ved:** Folkehelseinstituttet
- **Veiledere:** Dr. Berit Granum, ingeniør Tone Rasmussen, ingeniør Hege Hjertholm, Dr. Trine Husøy og Dr. Hubert Dirven

OSLOMET



Innhold

Forord.....	iv
Abstract	v
Sammendrag.....	vii
Forkortelser og ordforklaringer	ix
1. Innledning.....	1
1.1 Humane eksponeringsveier for kjemikalier.....	1
1.2 Hud.....	1
1.3 Mekanismer for hudopptak av kjemikalier gjennom hud.....	4
1.4 <i>Stratum corneum</i> og hud-skader.....	4
1.4.1 <i>Stratum corneum</i> og tørr hud.....	4
1.4.2 Huden og UV- eksponering.....	5
1.5 Opptak av kjemikalier via huden.....	6
1.6 Triklosan.....	7
1.7 Metylparaben.....	8
1.8 Risikovurdering	9
2. Problemstillinger og begrunnelser.....	10
3. Materialer og metoder	10
3.1 Human hud	11
3.2 Hudintegritet.....	11
3.3 Franz diffusjonscelle system	12
3.4 Beregning av total absorbert mengde testkjemikalie.....	14
3.5 Kjemikalier i studien	15
3.6 Metodeutvikling	16
3.6.1 Skading av <i>stratum corneum</i>	16
.....	18
3.7 Absorpsjon av triklosan og metylparaben på intakt hud	18
3.7.1 Korttids hudeksponering for ¹⁴ C-triklosan	18
3.7.2 Langtids hudeksponering for ¹⁴ C-metylparaben.....	18
3.8 Eksponering for ¹⁴ C-triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud	18
3.9 Eksponering for ¹⁴ C-metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud	19
3.10 Beregninger av systemiske eksponeringsdoser (SED) og sikkerhetsmarginer (MoS)	20
3.11 Statistiske analyser	21
3.12 Etiske forhold	21

4.	Resultater.....	22
4.1	UVB-behandling ved ulike tidsintervaller.....	22
4.2	Risping med kanyle og TEWL.....	22
4.3	Gjenvinning og hudabsorpsjon.....	22
4.3.1	¹⁴ C-triklosan og ¹⁴ C-metylparaben på intakt hud	22
4.3.2	¹⁴ C-triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud (forsøk 1)	25
4.3.3	¹⁴ C-triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud (forsøk 2).....	26
4.3.4	¹⁴ C-metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud	27
4.4	Beregning av systemiske eksponeringsdoser (SED) og sikkerhetsmarginer (MoS) for triklosan og metylparaben etter henholdsvis 20-minutters og 24-timers eksponeringstid	28
5.	Diskusjon.....	32
5.1	Metodeutvikling og metodiske hensyn.....	32
5.1.1	Testing av reseptorløsninger.....	32
5.1.2	Eksponering for UVB-lys.....	33
5.1.3	Teipstriping	34
5.1.4	Risping	35
5.1.5	Løsemiddel	35
5.1.6	<i>Ex vivo</i> hud for opptak av kjemikalier.....	36
5.1.7	Hudintegritet.....	38
5.1.8	Appliseringsmengde	39
5.2	Opptak av ¹⁴ C-triklosan og ¹⁴ C-metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud	40
5.3	Systemiske eksponeringsdoser (SED) og sikkerhetsmarginer (MoS) for opptak av triklosan og metylparaben på intakt og skadet hud	43
5.4	Andre begrensninger ved forsøkene i denne studien.....	46
6	Konklusjon	48
7	Referanser.....	49
8	Vedlegg	1
8.1	Testing av reseptorløsninger (metode og resultat)	1
8.2	Testing av blandbarhet til ¹⁴ C-metylparaben i fuktighetskrem.....	4
8.3	Optimalisering av prosedyren for separering av hudlagene	4
8.4	Optimalisering av prosedyren for vask av utstyr.....	4
8.5	Hud og TEWL.....	4
8.5.1	Opptak av ¹⁴ C-triklosan og ¹⁴ C-metylparaben på intakt hud	4
8.5.2	Forsøk 1 for hudopptak av ¹⁴ C-triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud.....	5
8.5.3	Forsøk 2 for hudopptak av ¹⁴ C-triklosan på intakt, teipskadet og rispet hud	7
8.5.4	Opptak av ¹⁴ C-metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud.....	8

8.6	Beregning av prosent arealet skadet ved risping	9
8.7	Diskusjon om Franz diffusjons cellesystem	10

Forord

Denne studien ble utført ved Folkehelseinstituttet fra 15. August 2018 til 15. Mai 2019. Jeg vil takke min hoved veileder Dr. Berit Granum for både kunnskapsmessig og språkmessig hjelp. Tusen takk for at du delte verdifulle kunnskaper med meg og belyste veien når ting var uklart. Tusen takk for at du brukte tiden din og var så positiv og hjelpsom. Jeg setter stor pris på det.

En stor takk til ingeniør Tone Rasmussen for hjelp med både språket under skriveprosessen og tekniske kunnskaper på laboratoriet. Tusen takk for at du alltid var der og gjorde ting klart for meg, delte informasjoner med meg, støttet meg og var veldig hjelpsom.

Jeg vil også takke ingeniør Hege Hjertholm og forskeren Dr. Trine Husøy for både kunnskapsmessig og språkmessig hjelp i skriveprosessen. I tillegg til ingeniør Bodil Hasseltvedt Tusen takk for at dere brukte tiden deres og hjalp meg med både språket og ryddingen i skriveprosessen samt fremføringer av prosjektet.

Jeg vil også takke avdelingsdirektøren, Dr. Hubert Dirven for å ha gitt meg tillatelse til å delta i dette spennende prosjektet. Det har vært veldig gøy å være i arbeidsmiljøet deres.

Jeg vil også takke Fornebuklinikken AS som har skaffet hud til biobanken Dermatox ved instituttet. Med deres hjelp ble det mulig å utføre dette prosjektet.

Jeg vil også takke familien og mannen min for å ha støttet meg og motiverte meg når jeg trudde jeg ikke skulle klare dette.

Oslo, Mai 2019

Rula Altaha

Abstract

People in everyday-life are exposed to different chemicals through the skin due to the use of cosmetics and personal care products. Preservatives are often used in these products to avoid bacterial growth and to increase the shelf life of the products. Substances like triclosan and methyl paraben are some of the preservatives used in cosmetics. Skin that comprises the protecting barrier against intruding toxic substances, may be damaged due to skin diseases, cold and dry climate or skin exposure to UV-light. Compromised skin could lead to increased dermal absorption of chemicals. There is a knowledge gap regarding the impact of damaged skin on dermal uptake of triclosan and methyl paraben. In risk assessment of chemicals, the margin of safety (MoS) is calculated to determine whether the daily exposure of a specific chemical may cause harm to human health. Due to lack of data on how damaged skin may affect MoS of triclosan and methyl paraben, the primary aim of the study was to compare the dermal uptake of triclosan and methyl paraben between damaged and intact skin barriers. The secondary aim was to study whether a potentially increased dermal uptake through a damaged skin barrier may reduce MoS to such an extent that the present use restrictions of these substances in cosmetics should be changed.

In this study, *ex vivo* human skin model (Franz diffusion cell system) was used. The skin was damaged by UVB-light, tapestripping and abrasion to resemble damaged skin barrier *in vivo*. Dermal uptake of ^{14}C -radiolabeled triclosan (0.3%) and methyl paraben (0.4%) following 20-minute and 24-hour exposure time, respectively, was studied. Dermal uptake for the test substances was measured on intact, tape stripped and abraded skin.

No statistically significant differences in TEWL-values ($p\text{-value} > 0,05$) were observed between control and UVB-exposed skin for both thawed and fresh human skin (thawed skin: control: 3.5 g/m^2 vs. UVB-exposed skin: 3.2 g/m^2 , fresh skin: control: 4.0 g/m^2 vs. UVB-exposed: 5.1 g/m^2). This may indicate that UVB-exposure does not affect skin integrity of *ex vivo* human skin).

There was a tendency of increase in dermal uptake of both ^{14}C -triclosan and ^{14}C -methyl paraben in damaged skin compared to intact skin (^{14}C -triclosan: $8.4 \pm 3.2\%$ on damaged skin vs. $5.6 \pm 4.7\%$ on intact skin, ^{14}C -methyl paraben: $87 \pm 19.4\%$ on damaged skin vs. $78 \pm 4.7\%$ on intact skin), However the increase was not statistically significant ($p\text{-value} > 0,05$).

Abrasion method, using a needle led to slightly higher dermal absorption of the test

substances than the tape stripping method. The values for dermal uptake obtained in this study were used to calculate the systemic exposure dose (SED).

SED for the aggregated exposure of the test substances was calculated, based on three product categories (hand wash soap, shower gel and deodorant) for triclosan and fifteen cosmetic product categories for methyl paraben. SED for aggregated exposure of triclosan (intact skin: 0.01269 mg/kg/bodyweight/day, damaged skin: 0.01252 mg/kg bodyweight/day) and methyl paraben (intact skin: 0.818 mg/kg bodyweight/day, damaged skin: 0.936 mg/kg bodyweight/day) were used to calculate the MoS for intact and damaged skin. MoS for the aggregated exposure to methyl paraben in cosmetic products on damaged skin was reduced compared to intact skin (1068 in damaged skin vs. 1222 in intact skin). No difference of significance in MoS was observed on damaged skin compared to intact skin for triclosan (958 on damaged skin vs. 946 on intact skin). All MoS-values were still above the limit value of 100. This means that the use of 0.3% triclosan in soaps and deodorants, and 0.4% methyl paraben in several cosmetic products can be considered safe both for intact and damaged skin.

Sammendrag

Mennesker blir hverdag eksponert for kjemikalier fra kosmetikk og kroppsspleieprodukter via huden. I kosmetikk er det ofte brukt konserveringsmidler for å hindre bakterievekst og forlenge holdbarheten til produktene. Eksempler på konserveringsmidler som er tillatt å bruke i kosmetikk og kroppsspleieprodukter er triklosan og metylparaben. Huden som fungerer som en barriere og beskytter kroppen mot inntrenging av toksiske stoffer, kan være skadet grunnet sykdommer, tørt og kaldt miljø eller UV-eksponering. Dette kan da føre til økt opptak av kjemikalier. Det er lite data på hvordan skadet hud påvirker opptaket av triklosan og metylparaben. Risikovurderingsprosessen er et viktig verktøy for å vurdere kjemikalienes mulige helsefare. Sikkerhetsmarginen (MoS) beregnes for å kunne si om den dosen av kjemikaliene man utsettes for daglig, faktisk utgjør en helserisiko. Siden det er lite data om hvordan MoS for triklosan og metylparaben kan påvirkes av skadet hud, baserte denne studien seg på å sammenligne opptaket av triklosan og metylparaben mellom intakt og skadet hudbarriere. Deretter ble det undersøkt om eventuelt økt opptak via hud med skadet barriere kan redusere MoS i slik grad at grenseverdier for bruk av disse stoffene i kosmetikk burde endres.

I denne studien ble en *ex vivo* human hudmodell (Franz diffusjonscellesystem) benyttet. Huden ble skadet med UVB-lys, teipstripping og risping med kanyler for å etterligne skadet hudbarriere *in vivo*. Opptak av ^{14}C -radiomerket triklosan (0,3 %) og metylparaben (0,4 %) etter henholdsvis 20-minutters og 24 timers eksponeringstid ble undersøkt. Opptaket ble målt på intakt, teipstrippet og rispet hud.

UVB-eksponering av både tint og fersk hud viste ingen statistisk signifikant økning (p-verdi > 0,05) i TEWL-verdiene mellom kontroll og UVB-eksponert hud (tint hud: kontroll: $3,5 \text{ g/m}^2$ vs. UVB-eksponert: $3,2 \text{ g/m}^2$, fersk hud: kontroll: $4,0 \text{ g/m}^2$ vs. UVB-eksponert: $5,1 \text{ g/m}^2$). Dette kan indikere at hudintegriteten til *ex vivo* human hud ikke blir påvirket av UVB-behandling.

Det ble funnet at opptaket av både ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben hadde en tendens til å øke for skadet hud i forhold til intakt hud (^{14}C -triklosan: $8,4 \pm 3,2 \%$ på skadet hud vs. $5,6 \pm 4,7 \%$ på intakt hud, ^{14}C -metylparaben: $87 \pm 19,4 \%$ på skadet hud vs. $78 \pm 4,7 \%$ på intakt hud), men at økningen ikke var statistisk signifikant (p-verdi > 0,05). Kanyleskadebehandling førte til høyere hudopptak av kjemikalier enn teipskadebehandling. Hudopptaksverdiene for testkjemikalier ble inkludert i beregningene av systemiske eksponeringsdosen (SED). SED

ved aggregerte eksponering for testkjemikaliene ble beregnet basert på tre produkter (såpe og deodorant) for triklosan og femten kosmetiske produkter for metylparaben. SED ved aggregerte eksponeringer for triklosan (intakt hud: 0,01269 mg/kg/kroppsvekt/dag, skadet hud: 0,01252 mg/kg kroppsvekt/dag) og metylparaben (intakt hud: 0,818 mg/kg kroppsvekt/dag, skadet hud: 0,936 mg/kg kroppsvekt/dag) ble benyttet til beregninger av MoS ved aggregerte eksponeringer for testkjemikaliene på intakt og skadet hud. MoS ved aggregerte eksponering for metylparaben i kosmetiske produktene på skadet hud ble redusert i forhold til intakt hud (1068 ved skadet hud vs. 1222 ved intakt hud). For triklosan ble det ikke funnet noen betydelig endring i MoS på skadet hud (958 ved skadet hud vs. 946 ved intakt hud). Alle MoS verdiene var fortsatt over grenseverdien på 100. Det vil si at bruk av 0,3 % triklosan i såpeprodukter og deodorant og 0,4 % metylparaben i en rekke ulike kosmetiske produkter kan anses for å være trygg når produktene påføres både intakt og skadet hud.

Forkortelser og ordforklaringer

AD: Atopisk dermatitt

H₂O: Vann

ECHA: Europeiske kjemikaliebyrå

MoS: Margin of Safety; Sikkerhetsmargin

NOAEL: No-observable-adverse-effect-level

NaCl: Natriumklorid

OECD: Organisasjon for økonomisk samarbeid og utvikling

SC: *Stratum corneum*

SCCS: Scientific Committee on Consumer Safety

SCCP: Scientific Committee on Consumer Products

SED: systemiske eksponeringsdosen

TEWL: Transepidermal vanntap

UV: Ultrafiolett

UF: Usikkerhetsfaktor

1. Innledning

1.1 Humane eksponeringsveier for kjemikalier

Menneskene blir utsatt for ulike kjemikalier med eller uten sin vilje (1), via fordøyelsen av mat og drikke, via innånding og via dermal absorpsjon av produkter som inneholder kjemikaliene (2).

Eksposeringen av kjemikalier kan føre til helseeffekter som blant annet irritasjon av hud og slimhinner, astma, allergi, kreft og skader på foster. I tillegg kan kjemikalier påvirke det endokrine systemet (3). For høy eksponering for kjemikalier kan redusere menneskets forventet levealder på grunn av alvorlige helseskader. Måten et kjemikalie tas opp i kroppen avhenger av fysiske og kjemiske egenskapene til kjemikaliet og ikke minst av type eksponeringsveier (via innhalasjon, hudeksponering eller oralt inntak). Kjemikalier i form av gass, damp eller respiratoriske partikler tas hovedsakelig opp via øvre og nedre luftveier. Kjemikalier i mat og drikke, samt kroppspeieprodukter til oral bruk, kan tas opp via fordøyelsessystemet. Kjemikalier som påføres huden, for eksempel kroppspeieprodukter, kan komme inn i kroppen via penetrering av huden. Ved dermal absorpsjon av toksiske kjemikalier, kan de enten gi lokale reaksjoner som hudirritasjon eller hudallergi, men de kan også tas opp i blod- og lymfesystemet og føre til negative helseeffekter i form av for eksempel kreft, fosterskader og skader på nervesystemet (1, 3).

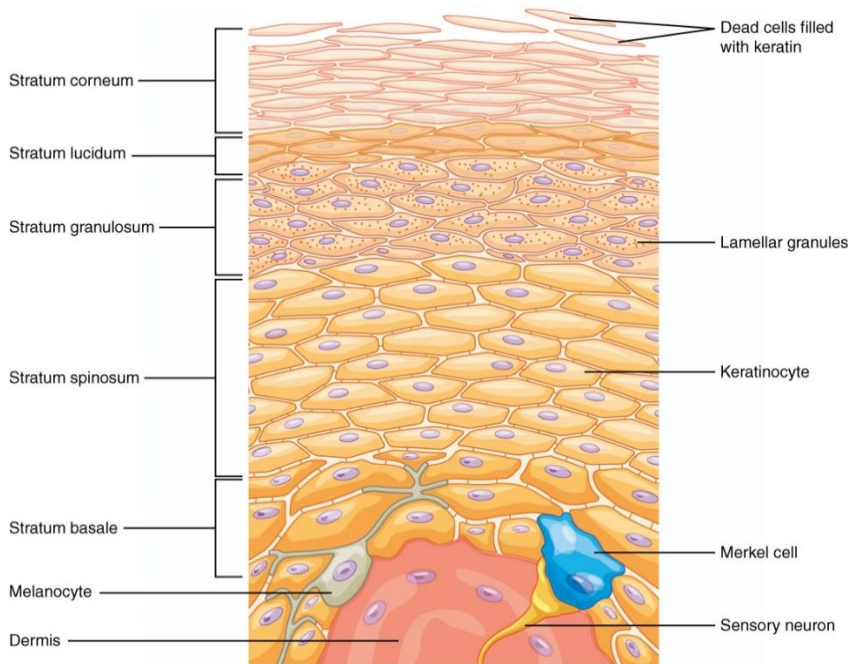
Det er per i dag få studier på hudopptak av kjemikalier selv om dette er en viktig eksponeringsvei (4). Fokuset for denne studien er derfor hudeksponering.

1.2 Hud

For å kunne forstå opptak av kjemikalier gjennom huden er det viktig å ha en grundig kunnskap om hudens anatomi.

Human hud er kroppens største organ med et overflateareal på 2 m² hos en gjennomsnittlig voksen person (den utgjør 15-16% av kroppens totale vekt (5, 6). Huden består av 3 hovedlag; Epidermis, dermis og hypodermis (subcutis) (figur 2) (1). Epidermis er det ytterste laget på huden og er det viktigste hudlaget når det fokuseres på hudopptak av kjemikalier. Den er ca 200 µm tykk og består av 4-5 underlag avhengig av hudområdene i kroppen: *stratum germinativum* (basale cellelaget), *stratum spinosum*, *stratum granulosum* og *stratum corneum*

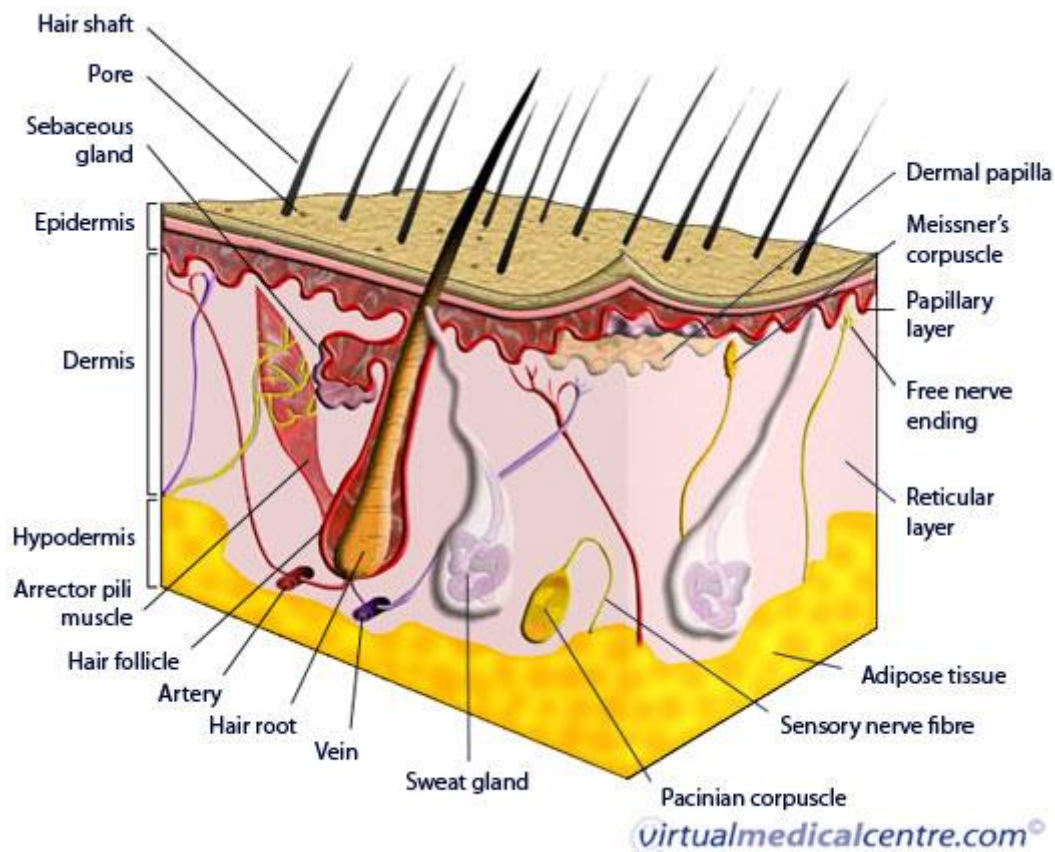
(ytterste cellelaget) (SC) (figur 1). *Stratum lucidum* ligger mellom *stratum granulosum* og *stratum corneum* og finnes kun i epidermis som tilhører håndpalmene og fotsålene.



Figur 1. Epidermis til en tykk hud. Den består av *stratum germinativum* (basale cellelaget), *stratum spinosum*, *stratum granulosum* og *stratum corneum*. Hentet fra: <https://courses.lumenlearning.com/suny-wmopen-biology2/chapter/structure-and-function-of-skin/>.

Funksjonene til lagene i epidermis som ligger under SC (levende epidermis) er metabolisering av kjemikalier som kommer inn i kroppen gjennom huden, aktiv transport av kjemikalier og overvåking (1, 5). I tillegg til keratinocytter, består epidermis av melanocytter (celler som produserer melanin som gir huden farge) som ligger i *stratum germinativum*. Merkel celler (mekanoreseptorer som er involvert i berørings stimuleringer) og langerhansceller (dendrittiske celler som spiller hoved rolle i immunforsvarets funksjon) ligger også i *stratum germinativum* i epidermis (5-7). Det er ingen blodårer i epidermis (3). Barrierefunksjonen ligger i øverste laget til epidermis (SC) og beskytter mot blant annet kjemikalier og mikroorganismer i miljøet som kan være farlig for kroppen, i tillegg beskytter SC huden også mot vanntap (1, 8, 9). Avhengig av hudområde og alder, består SC av 10-20 lag av døde celler som inneholder keratin (korneocytter). Tykkelsen på SC er ca. 10-15 μm (5, 7, 10, 11). Det er omtrent ett korneocyt-lag som flases av naturlig per dag (12). Disse korneocytene mangler cellekjerner og er bundet sammen ved hjelp av proteinene korneodesmosomer og intercellulære lipider som er veldig resistente mot kjemiske og fysiske stimuleringer (1, 8, 13). Intercellulære lipider består av blant annet ceramider (50 %) og fettsyrer (25 %), i tillegg til kolesterol (20 %), triaglyserol (3 %) og kolesterol-estere (1). Tykkelsen på hudområdene

bestemmes av SC laget. Tykkelsen er avhengig av hvor mye de ulike hudområdene i kroppen brukes. For eksempel er hudområdene på fotsålene tykke da disse hudområdene brukes mye for å kunne gå (1, 5, 7). Tykkelsen på SC bestemmer hastigheten til hudopptaket av kjemikalier (5). Jo tynnere SC er, jo høyere vil opptaket av kjemikalier kunne være (10). Forskjellen mellom SC og levende epidermis er at SC består av flate keratinocytter som har mistet sine kjerner, nemlig døde celler. SC er lipofil og inneholder 15 % vann (14). Levende epidermis består mye av levende keratinocytter (i tillegg til andre typer celler) og inneholder ulike typer metaboliske enzymer. Derfor skjer metabolismen av kjemikalier i epidermis laget (1). Levende epidermis og dermis er hydrofile og inneholder 70 % vann (14).



Figur 2. Et tverrsnittsbilde av hud med de tre essensielle hudlagene. Epidermis (øverste laget) fungerer som en barriere og beskytter kroppen mot toksiske stoffer/mikroorganismer. Epidermis mangler blodårer. Dermis (laget i midten) inneholder blodårer, hårrøtter og svettkjertler. Hypodermis (nederste laget) består av fettceller. Hentet fra: <https://www.myvmc.com/anatomy/human-skin/>

Dermis er et tykt lag som ligger under epidermis og består av en matrise av kollagen- og elastin konnektivt vev og et nettverk av blodårer og nerver (3, 6). Disse gir huden sin styrke og elastisitet. I tillegg gir blodkapillærene næring til de ulike hudlagene (6). Oppgavene til dermis er å regulere hudtemperaturen og beskytte kroppen til en viss grad mot fysiske skader

(6). Talgkjertlene i dermis gjør at huden blir svakt sur, med pH mellom 4,5 og 6,0 (1). Denne pH-en er viktig for å hindre invadering av ulike typer mikroorganismer gjennom huden (1).

Hypodermis er laget som ligger under dermis og består av fettceller (adipocytter). Dette laget beskytter kroppen ved å fungere som en isolator mot kalde temperaturer på utsiden og som en absorber for varme og fysisk sjokk (1, 7).

1.3 Mekanismer for hudopptak av kjemikalier gjennom hud

Kjemikalier kan tas opp i hud via to hovedveier: veien gjennom SC og veien gjennom hudstrukturer som talg- og svettekjertler og hårgroper (1). Hudstrukturene er en viktig transportvei til hydrofile og store molekyler (10). Siden disse strukturene utgjør 0,1 % av totale arealet til menneskehuden, legges det ofte ikke vekt på denne transportveien (7, 10).

Hudlaget som begrenser diffusjonen for mange kjemikalier er lipofile SC, men de hydrofile levende epidermis og dermis fungerer også som barrierer for veldig lipofile kjemikalier (15). Opptaket gjennom SC blir delt i intercellulære og intracellulære veier (1). I intercellulært opptak, diffunderer kjemikallet gjennom lipidene i SC, mens i intracellulære opptak, diffunderer kjemikallet gjennom korneocytene i SC (1). I begge tilfellene må kjemikallet kunne diffundere gjennom intercellulære lipidene og det er derfor lipidene er en viktig faktor for begrensning av hudopptak av kjemikalier (10).

1.4 *Stratum corneum* og hud-skader

1.4.1 *Stratum corneum* og tørr hud

Det er mange faktorer som kan føre til tørr hud, blant annet alder, tørt og kaldt klima, sykdom, bruk av visse sterke kjemikalier, og hyppig vasking (15-17). Tørr hud oppstår ved mangel på intercellulære lipider som ceramider (17, 18), i tillegg til reduksjon i talgproduksjon som er avhengig av alder. Tørr hud fører da til økning i transepidermisk vanntap (TEWL) (16, 18, 19).

I SC finnes også proteinet filaggrin (20). Noen av hovedrollene til filaggrin er å gi styrke, hydrere og regulere pH i SC (1, 20). Personer som har atopisk dermatitt (AD), har ofte filaggrinmuterte gener (i tillegg til andre mutasjoner). Dette vil føre til redusert eller ingen produksjon av filaggrin og dermed til en tørr, betent hud som har en nedsatt barriere-funksjon grunnet færre lag av korneocytter og ceramider (mellom korneocytene) (20, 21).

Per i dag er det estimert at AD rammer 3,5-4,4 % av voksne i den europeiske populasjonen og 20 % av barna (22).

Det er også blitt estimert at tørr hud rammer 30 til 75 % av eldre befolkningen (≥ 56 år) (23, 24).

1.4.2 Huden og UV- eksponering

Solbrun hud blir ofte sett på som fint blant de europeiske og amerikanske befolkningene. På grunn av dette har soling (naturlig eller i solarium), og dermed eksponering for ultrafiolett-lys (UV-lys) vært utbredt i disse områdene (25, 26). I 2014 ble det estimert at 55 % av universitetsstudenter i nord- og vest-Europa har brukt solarium (27). Dette tyder på at mange blir utsatt for UV-lys som kan føre til solbrent hud. Det er estimert at 50 % av nord-europeiske befolkningen opplever å bli solbrent (28). Det tar ca. 3 til 5 timer etter at huden er blitt utsatt for UV-lys til huden blir solbrent (29).

UV-lys består av: UV-A (bølgelengde: 315-400 nm), UV-B (bølgelengde: 280-315 nm) og UV-C (bølgelengde: 100-280 nm) (30). Det meste av UV-C strålene blokkeres allerede i ozon-laget. Det vil si at UV-strålene som treffer jordoverflaten har bølgelengdene fra 280 til 400 nm (nemlig UV-B og UV-A strålene) (31, 32). Fordeler med eksponering for UV-lys er dannelse av D-vitamin i kroppen, i tillegg til at strålene benyttes til behandling av visse sykdommer som vitiligo og psoriasis (30, 33). Alvorlige ulemper ved eksponeringen for UV-lys er blant annet induksjon av hudkreft og andre hudskader som for eksempel erythema (solbrenning), økt aldring av huden, og inflammasjon (30, 33).

I år 2000 ble det rapportert 60 000 dødsanfall i hele verden grunnet sykdommer forårsaket av UV-eksponering (33). Enkelte studier viser at UV-A strålene er ansvarlige for hudaldring, mens UV-B strålene er ansvarlige for solbrenthet (34, 35).

De fleste studiene som er gjort på eksponering av epidermis for UV-lys har vist at UV-lys indirekte induserer skade i barriere-funksjonen; via skade på nukleinsyre-nivå og utskilling av substanser som er ansvarlig for erythema-induksjon (29, 36-38). Til min kjennskap, er det få studier publisert som undersøker om UV-eksponering av epidermis gir direkte proteinskader som fører til en nedsatt barriere-funksjon.

Denne studien baserer seg derfor på å undersøke opptak av kjemikalier etter UV-eksponering av intakt, frossen hud i en human *ex vivo*-modell.

1.5 Opptak av kjemikalier via huden

Huden fungerer som en barriere som beskytter kroppen mot skadelige kjemikalier ved å redusere eller hindre hudopptak (3). Noen kjemikalier kan trenge gjennom levende epidermis hvor de kan bli metabolisert ved hjelp av ulike enzymer (3).

Hudopptaket av kjemikalier er avhengig av mange fysiokjemiske faktorer som blant annet molekylvekten og partisjons koeffisienten til kjemikaliet, i tillegg til viskositeten til løsemiddelet til kjemikaliet (15). Andre faktorer som påvirker hudopptaket er tykkelsen på SC, mengde hår på huden, og intercellulære lipidsammensetninger i SC. (5, 39). I tillegg til hudens temperatur, fuktighet og metabolismen. Blodstrømning under epidermis og den naturlige avflassing av SC påvirker også hudopptaket av kjemikalier (15).

En av kildene til hudeksponering for kjemikalier er kroppspfleieprodukter som shampoo, deodoranter, håndsåpe, fuktighetskrem, solkrem, sminke osv. (40, 41). kroppspfleieprodukter må tilsettes konserveringsmidler for å unngå bakterievekst og forringelse av produktet. Blant dem er parabener, isothiasolinoner, organiske syrer, klorheksidin og triklosan (42). I denne studien fokuseres det på metylparaben og triklosan (43, 44).

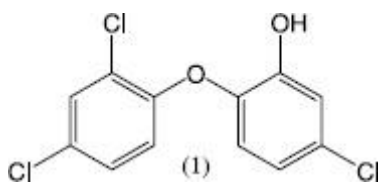
Det finnes likheter (og ulikheter) mellom human hud og hud fra dyr. En dyreart som har mange likheter med mennesker er grisen. Grisehud ligner på menneskehud blant annet i hår mengde (20 hårtråder/cm² i griseørene vs. 14-32 hårtråder/cm² hos mennesker), histologien til epidermis og biokjemiske likheter i visse proteiner i SC. Førstseks studier ble gjort for å sammenligne hudopptak av 77 kjemikalier mellom hud fra gris og menneske. Disse studiene indikerte at opptak av kjemikalier i stor grad var like, men likheten varierte avhengig av kjemikalienes egenskaper (39). Av gnagere har rottene mest hudlikheter med mennesker. Men gnagere generelt har høyere opptak (opptil 10 ganger høyere) enn mennesker på grunn av et tynnere lag med SC (1, 7, 39). Siden det er ulikheter i strukturen til hud mellom mennesker og dyr, fører dette til ulike grad av opptak av kjemikalier (39). For å oppnå mest prediktive data som kan benyttes i toksikologi og risikovurderinger for humant opptak av kjemikalier, burde huden som benyttes i slike studier, ha like anatomiske, fysiologiske og biokjemiske egenskaper med menneskehud (5, 39). Siden resultater på opptak via hud oppnådd fra studier på dyr er vanskelig å predikere på mennesker, er det ønskelig med humane hudmodeller (5, 39). I tillegg har noen studier klart å oppnå korrelasjoner i opptak mellom *ex vivo* og *in vivo* humane hudmodeller, derfor er en *ex vivo* human hudmodell en bra surrogat modell for *in vivo* human hud (5).

1.6 Triklosan

Triklosan (CAS 3380-34-5) er en bred-spektrert antibakteriell agent som ofte er brukt i tannkrem, såper og deodoranter og andre husholdningsprodukter grunnet kjemikalets effektive antibakterielle egenskaper (45-47). I 2015 ble det estimert at den globale produksjonen av triklosan var på 4,8 millioner kg (48).

Triklosan er både en eter og en fenol (figur 3), og det kjemiske navnet er 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol (IUPAC) (47). Den blir metabolisert hovedsakelig i leveren (og i mindre grad i huden) og skilt ut av nyrene hovedsakelig i urin hos mennesker (43, 48, 49).

Triklosan har en molekylvekt på 289,5 g/mol og en fordelingskoeffisient ($\text{Log } P_{ow}$) på 4,8 som vil si at den er lipofil da $\text{log } P_{ow}$ er større enn 3 (7). Den absorberes lett gjennom huden (41, 47, 50). Triklosan er godt løselig i propylenglykol (>100 g/100 g propylenglykol) og lite løselig i vann (0,001 g/100 g vann) (47).



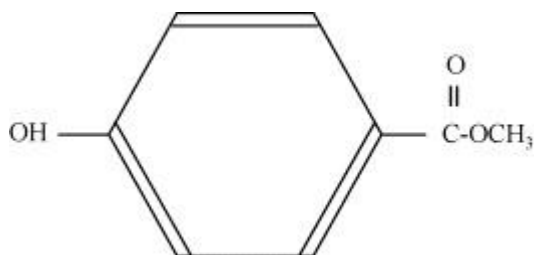
Figur 3. Bilde av triklosan. Kjemiske gruppene som kjennetegner triklosan er fenoler og eter (46).

Triklosan har vist seg å kunne ha negative helseeffekter som forstyrrelser i det endokrine systemet, reproduktive og utviklingsdefekter og hemming av musklene i organismen. I tillegg kan eksponeringen for triklosan føre til utvikling av allergi/astma. I mange studier ble det funnet ut at triklosan fører til blodtoksisitet i mange dyrearter (51). Disse effektene ble funnet i både dyr og mennesker (48, 50).

Visse studier indikerer at mennesker i hele verden blir eksponert for triklosan (48), hovedsakelig gjennom fordøyelsessystemet og dermal absorpsjonen (43, 52). Hovedkilden til den dermale eksponering for triklosan er kroppsspleieprodukter. Ifølge EU-kommisjonen er maksimalt tillatt innhold av triklosan i kroppsspleieprodukter 0,3 % bortsett fra for munnskyllevann hvor maksimalt tillatt innhold er 0,2 % (47). Da mennesker blir eksponert for triklosan, blir kjemikallet ofte detektert i morsmelk, blod og urin (43, 53). Nyfødte eksponeres for triklosan hovedsakelig gjennom morsmelk, og dette har ført til en økt bekymring for mulige helseeffekter hos ammede barn (53).

1.7 Metylparaben

Metylparaben (CAS No. 99-76.-3; IUPAC: methyl 4-hydroxybenzoate) er et konserveringsmiddel som ofte blir brukt i medisiner, mat og særlig i kroppspeieprodukter som tannkrem, deodoranter, fuktighetskrem, såper og sminke (44, 54-56). I følge EU-kommisjonen er maksimalt tillatt innhold av metylparaben i kosmetikk 0,4 % dersom det kun er metylparaben tilstede i produktet, og 0,8 % dersom det er en blanding av flere parabener i selve produktet (57). Metylparaben er en metylester av *p*-hydroksybenzosyre (figur 4) og er en stabil komponent. Det absorberes raskt, med fullstendig opptak gjennom huden (54, 55). Den har en fordelingskoeffisient (Log P_{ow}) på 1,96 (58) som vil si at det er både lipofil og hydrofil og kan transporteres gjennom hudbarrieren både via lipid og vandige transportveier i SC (7). Metylparaben har en molekylvekt på 152,149 g/mol. I kroppen metaboliseres det og skilles ut hovedsakelig i urinen (54).



Figur 4. Molekylære strukturen til metylparaben. Metylparaben er en metylester av *p*-hydroksybenzosyre med alkohol, benzen og estersom er de kjemiske, funksjonelle gruppene som kjennetegner den (56).

Metylparaben kan forårsake allergiske kontakt dermatitt, men regnes for å være svakt allergen (54). I tillegg kan metylparaben ha reproduksjonstoksiske effekter (44) og østrogenlignende effekter (anti-androgeniske effekter) (59). De østrogenlignende effektene er mer enn 1000 ganger svakere enn kroppens naturlige østrogen (44, 57). En annen studie indikerer at metylparaben kan føre til differensiering av fettceller (adipocytter), som kan føre til fedme (60).

Metylparaben og andre antimikrobielle agenter er ofte detektert i humant blod, brystmelk og vev. Dette fører til økt bekymringer for mulige effekter på folkehelsen (55). I følge European chemical agency (ECHA) lages og importeres det 1000 til 10 000 tonn metylparaben i Europa per år (44).

Når det gjelder lokale effekter i huden, er det en studie som tyder på at eksponering av UVB stråling på metylparaben-behandlet human hud førte til en forsterket skade til keratinocytter i *stratum corneum* laget (56).

1.8 Risikovurdering

Risikovurdering er en prosess som brukes til å vurdere helseeffekter av kjemikalier. Den gir en vitenskapelig forklaring av mulig risiko ved eksponering av kjemikalier. Risikovurderinger benyttes av statlige og internasjonale/nasjonale organisasjoner (for eksempel europeiske kjemikaliebyrået (ECHA), EU-kommisjonen og nasjonale myndigheter (Helse-og-omsorgsdepartementen og Miljødepartementet) som et grunnlag til forebyggende tiltak mot mulige helse- og miljøeffekter, ved å lage nye retningslinjer for bruk av kjemikalier i kosmetikk og kroppspeleprodukter (47).

En risikovurdering består av følgende trinn:

- **Farevurdering:** Dette er en beskrivelse av mulige skadelige effekter et kjemikalie kan ha. Dette trinnet omfatter data fra humane (epidemiologiske) studier, fra forsøk på dyr og fra *in vitro* studier.
- **Dose-respons vurdering:** I dette trinnet bestemmes forholdet mellom dosene av kjemikaliet man undersøker og hendelsene av toksiske effektene. Data som benyttes i dette trinnet er ofte hentet fra forsøk på dyr.
- **Eksponeringsberegninger:** I dette trinnet fokuserer man på mengde kjemikalie populasjonen blir eksponert for. I disse beregningene inngår både frekvens, varighet og mengde. Dersom nok data er tilgjengelig, kan eksponeringen beregnes for ulike eksponeringsveier. I dette trinnet beregnes den systemiske eksponeringsdosen (SED) som er mengde kjemikalie som tas opp i kroppen.
- **Risikovurdering:** I dette trinnet gjør man en vurdering om kjemikaliet kan gi helseskader hos befolkningen. Her benyttes data fra de tre foregående trinnene (41, 61).

Ved farevurderingstrinnet defineres det no-observable-adverse-effect-level (NOAEL) som er den høyeste konsentrasjonen av et kjemikalie en person blir utsatt for som ikke gir en negativ helseeffekt. NOAEL brukes da til beregning av sikkerhetsmargin (MoS; Margin of Safety) for kjemikaliet. MoS er forholdet mellom NOAEL og den systemiske humane eksponeringsdosen (SED) (62).

En MoS-verdi som er lik eller større enn 100 vil si at den daglige eksponeringen for kjemikaliet anses å være trygg. Verdien 100 kommer fra en usikkerhetsfaktor (UF) på 10 for forskjeller mellom arter (f.eks. data fra studier på mus for fastsettelse av NOAEL) og en UF på 10 for interindividuelle forskjeller hos mennesker (for å ta høyde for at ikke alle

menneskene er like sensitive med tanke på kjemikaliet). MoS for kjemikalier i kroppspeieproduktene baserer seg hovedsakelig på hudopptak via intakt hud (63, 64). Dersom NOAEL bestemmes ut fra humane studier, kan man vurdere å bruke en MoS på 10 i stedet for 100 (41, 61).

2. Problemstillinger og begrunnelser

Mennesker blir hver dag utsatt for kjemikalier fra kroppspeieprodukter via huden (65). Blant kjemikaliene som brukes i kroppspeieprodukter er triklosan og parabener som metylparaben (63, 66). Huden fungerer som en barriere som beskytter kroppen mot inntrenging av toksiske stoffer og mikroorganismer som bakterier (1, 9). Det er ikke alltid slik at hudens barrierefunksjonen er intakt. Det er flere årsaker til en skadet hudbarriere: AD, tørr hud og UV-eksponering er noen av de (33, 67, 68). Enkelte studier indikerer at det kan være høyere absorpsjon av kjemikalier ved skadet hudbarriere enn ved intakt hud (69-71). Det er derimot lite data på opptak av metylparaben og triklosan på en skadet hudbarriere.

Ikke alle kjemikaliene som kroppen utsettes for er trygge. For å vurdere kjemikalienes mulige helsefare, er risikovurdering av kjemikaliene en viktig prosess (3). MoS, et viktig trinn i risikovurderingsprosessen, beregnes for å se om den dosen av kjemikaliet man utsettes for daglig, faktisk utgjør en helserisiko (3, 62). MoS for kjemikalier i kroppspeieproduktene baserer seg hovedsakelig på opptak av kjemikalier på intakt hud (63, 64).

Hensikten med denne studien er derfor å undersøke:

- Opptak av triklosan og metylparaben gjennom både intakt hud og hud med skadet barriere (*stratum corneum*)
- Om økt opptak via huden grunnet hud med skadet barriere reduserer sikkerhetsmarginen i slik grad at grenseverdier for bruk av disse stoffene i kroppspeieprodukter bør endres.

3. Materialer og metoder

Eksperimentene i dette prosjektet ble utført etter OECD retningslinje 428 for hudopptak i en *ex vivo* human hudmodell (72), og EU-kommisjonens kriterier for *in vitro* metoder for hudopptak av kjemikalier og kosmetikk (12), samt EU-kommisjonens dokument “Scientific Committee of Consumer Safety’s (SCCS) Notes of Guidance, 10-ende revisjon” (41).

3.1 Human hud

I dette prosjektet ble det benyttet human hud, donert fra pasienter som har gjennomgått bukplastikk, foretatt ved Fornebuklinikk AS. Hudene ble lagret ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i biobanken Dermatox ved Folkehelseinstituttet. Hudbitene ble donert anonymt med kun informasjon om alder og kjønn. Huddonorene har gitt skriftlige samtykker til bruk av huden til forskning i dette prosjektet. Bukhuden ble valgt fordi man kan få tilstrekkelig med hud per donor. Ved hvert forsøk i denne studien, ble huden tint i romtemperatur og hudprøvene på ca. $3\times 3\text{ cm}$ ble skjært av underliggende fettvevet ved hjelp av en dermatom (Aesculap AG, B. Braun Company, Tuttlingen, Tyskland) med en tykkelse på $0,5\text{ mm}$. Det ble gjort visuelle inspeksjoner av hudprøvene og biter, og hudprøvene som hadde strekkmerker, tatoveringer, arr, tydelige hår og andre skader ble ekskludert fra forsøkene.

3.2 Hudintegritet

Hudprøvene som skal benyttes i forsøk, må ha god hudintegritet. Det finnes ulike metoder for å måle hudintegriteten, som transepidermalt vann tap (TEWL), transepidermalt elektrisk resistens (TEER) og titrert vannstrømning (TWF). I denne studien ble TEWL brukt for å måle hudintegriteten.

TEWL-instrumentet som ble brukt i dette prosjektet (Cortex technology ApS, Danmark), inneholder to sensorer som måler fuktigheten i lufta som ligger rett over hudoverflaten, og to andre sensorer som måler temperaturen. Fra disse parameterne kalkuleres tetthetsgradienten til vanndamp som passerer gjennom huden og målingene blir oppgitt i $\text{g}/\text{m}^2/\text{time}$. TEWL målingene påvirkes av endring i fuktighet og temperatur. De optimale betingelsene for TEWL metoden er en temperatur på $22\text{-}24\text{ }^{\circ}\text{C}$ og en luft fuktighet på $40\text{-}60\%$. Måleområdet for TEWL instrumentet er fra 0 opptil $250\text{ g}/\text{m}^2/\text{time}$ (73). Høyere TEWL-verdier betyr at hudbarrieren er mer skadet. TEWL måling i dette prosjektet ble utført i et lukket rom med minimale bevegelser, under konstant romtemperatur ($21,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) og fuktighet ($23,5\%$).

TEWL ble målt tre ganger på hver hudprøve som ble brukt i forsøkene i dette prosjektet. Hudprøvene med TEWL verdier som var høyere enn $6,23\text{ g}/\text{m}^2$ ble ekskludert. Denne grenseverdien er basert på en pilotstudie utført ved Folkehelseinstituttet, av masterstudenten Martine Malmer Herud (81), der huddonorer ($n=29$) ble målt for TEWL og gjennomsnittet og standardavviket ble beregnet. I pilotstudien ble hudprøvene også vurdert utseendemessig basert på visuelle inspeksjoner, der hudprøver som hadde strekkmerker, tatoveringer, arr, mye hår og skader ble ekskludert fra forsøkene.

3.3 Franz diffusjonscelle system

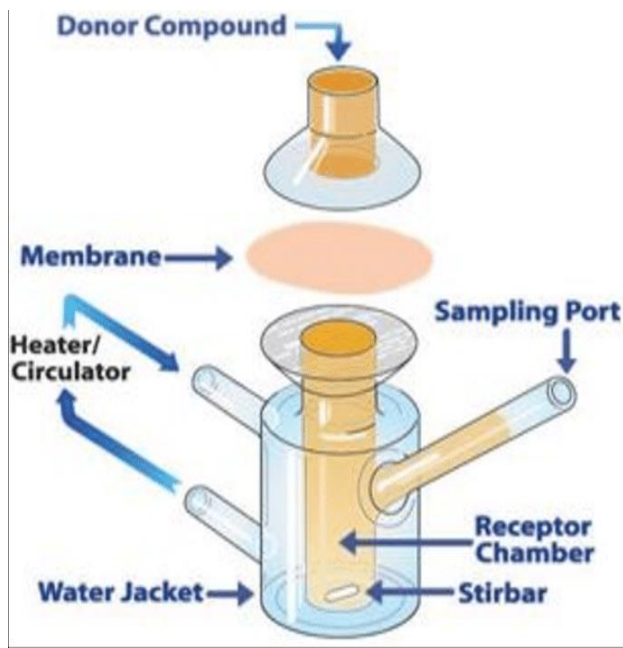
Franz diffusjonscellesystem (kalt Franz celler) (PermeGear, Hellertown, PA/USA) for *ex vivo* eksperimentene ble benyttet for hudopptak av ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben (figur 5). Franz celler er et statisk system hvor hudprøvene monteres mellom et donor- og et reseptor kammer. Hudområdet som eksponeres for test-kjemikaliene har en størrelse på $1,76\text{ cm}^2$ per celle.

Radioaktive testkjemikalier ble påsatt huden gjennom donorkammeret. I retningslinjer for dermal absorpsjon (SCCS/1358/10, OECD nr. 428) er det oppgitt at appliseringsdosen for testkjemikaliet i væskeform skal være $10\text{ }\mu\text{l}$ per cm^2 hudareal (72,12). Det skal tilsvare et reelt eksponeringsscenario (72, 15). Siden hudarealet i Franz cellene som ble eksponert for ^{14}C -testkjemikaliet var $1,76\text{ cm}^2$, derfor ble appliseringsvolumet for ^{14}C -triklosan i propylenglykol på $17\text{ }\mu\text{l}$.

Siden ^{14}C -metylparaben ble løst i et semi-fast løsemiddel, er det oppgitt i EU-kommisjonen og OECD retningslinje 428 at appliseringsvolumet som utgjør det reelle eksponeringsscenariot skal være $1\text{-}5\text{ mg/cm}^2$ hudområde (72, 12). Det ble da brukt $4,5\text{ mg}$ ^{14}C -metylparaben i krem til $1,76\text{ cm}^2$ eksponeringsområde, som utgjør ca. $2,5\text{ mg/krem/cm}^2$.

Reseptorkammeret består av et indre og et ytre kammer. Indre kammeret ble fylt med reseptorløsning opp til kanten, slik at reseptorløsningen kom i kontakt med huden. Reseptorløsningen i en diffusjonscelle er en løsning som testkjemikaliet løser seg i etter at det er blitt absorbert gjennom huden. En optimal reseptorløsning er en løsning som testkjemikaliet er godt løselig i, samtidig bør den ligne situasjonen *in vivo* (med tanke på væskene i kroppen til en organisme). Ulike reseptorløsninger (Natriumklorid (NaCl), destillert vann (H_2O), 30 % etanol, 50 % etanol og 70 % etanol) ble testet ut for å finne en optimal reseptorløsning til ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben. Det ble funnet ut at 30 % etanol i vann ga en optimal løselighet for ^{14}C -triklosan og at 0,9 % NaCl_2 ga en optimal løselighet for ^{14}C -metylparaben. Se vedlegg 8.1

Alle de ytre diffusjonskamrene ble koblet sammen via slanger og deretter koblet til et vannsirkulasjonssystem som holdt en konstant temperatur på ca. $32\text{ }^\circ\text{C}$ som er den normale temperaturen til huden hos mennesker. Etter påsetting av ^{14}C -testkjemikaliet til huden i forsøkene for dette prosjektet, ble donorkammer og uttaksport dekket med parafilm for å forhindre fordamping av reseptorløsning og kjemikaliene.



Figur 5. En Franz diffusjonscelle. Den består av et donorkammer (øverste delen i figuren) og et reseptorkammer (nederste delen i figuren). Hudprøven (membranen i figuren) monteres mellom dem. Det radioaktive testkjemikaliet tilsettes til hudprøven gjennom donorkammeret. Hentet fra:

<http://permeagear.com/wp-content/uploads/2015/08/primer.pdf>

Etter 24-timers inkubering, ble hudprøvene fjernet fra diffusjonscellene og plassert på et skjærebrett. Eksponeringsområdet, ble stanset ut ved hjelp av et 20 mm hulljern. Rester av hudsirkelene ble lagt i telleglass. Hudoverflatene ble vasket med filterpapir, fuktet med reseptorløsningen (tre ganger for hudprøvene som ble eksponert for ^{14}C -metylparaben og to ganger for hudprøvene som ble eksponert for ^{14}C -triklosan) og tørket med tørt filterpapir. Alle filterpapirene ble lagt i egne telleglass. Øverste lagene til *stratum corneum* (SC) ble fjernet ved hjelp av teipstripping. Det ble benyttet fem Corneotape biter med et trykk på ca. 225 gram/cm² i tre sekunder med en rask fjerning av teip. Trykket ble laget ved hjelp av en Cuderm D-Squame stav applikator (Cuderm Corporation, Dallas, USA). Hver teip ble lagt i eget telleglass. Antall ganger teipstripping på fem for å fjerne øverste lagene av SC ble bestemt basert på en pilotstudie, utført tidligere på Folkehelseinstituttet. I studien ble det konkludert med fem teipstripping med Corneotape biter for å fjerne ^{14}C -merket testkjemikaliet i øverste lagene i SC. Dette ble gjort for at hudopptaket av kjemikaliet skal ligne på avflassing av huden som skjer naturlig *in vivo*, og som dermed fører til at kjemikaliet som ligger i de øverste lagene til SC ikke blir absorbert i dypere lagene til huden. Derfor ble absorpsjon av testkjemikaliet i disse teipbitene ikke tatt med i videre beregninger av totale hudabsorpsjon (kapittel 4.4). Pilotstudien ble ikke publisert.

Epidermis og dermis ble skilt fra hverandre ved hjelp av vannbad på 62 °C. Hudsirkelene ble lagt i et tørt begerglass og holdt ned i vannbadet i 2 minutter. Deretter ble epidermis og dermis skilt fra hverandre ved hjelp av pinsetter. Epidermis, dermis og den delen av huden som var igjen etter utstansing av hudsirkelen ble lagt i hver sin 1 ml oppløsningsmiddel Solvable™ og inkubert på en rister (Belly dancer fra Alfa-lab, Oslo, Norge) ved 60 °C over natt. Deretter ble løsningene overført til egne telleglass.

Alle telleglassene med prøvene ble telt i scintillasjonsteller (Tri-Carb 2810TR, PerkinElmer, Oslo, Norge). Telleglassene ble fylt med 4 ml UltimaGold telleveske før de ble satt i scintillasjonstellemaskinen. Absorpsjonsverdiene i alle prøvene ble automatisk trukket fra verdien for en negativ kontroll (telleglass som kun inneholdt telleveske).

3.4 Beregning av total absorbert mengde testkjemikalie

Deteksjonsverdiene ble gruppert i ulike kategorier: ‘Hudvask’, ‘SC’, ‘epidermis’, ‘dermis’, ‘reseptorløsning’ og ‘utstyr’.

‘Hudvask’ kategorien inkluderte prøvene fra tørking av ¹⁴C-merket testkjemikalie på huden (vask av huden med fuktige filterpapir og tørking av huden). Kategorien ‘utstyr’ inkluderte prøver fra deler av hudbitene som var igjen etter utstansing av hudsirkelene, dampen tørket av parafilmene og selve parafilmene og vask og tørk av: donor- og reseptorkammer og petriskål og begerglassene for hver prøve. Disse er deteksjonsverdier for ¹⁴C-testkjemikalie som ikke ble absorbert av selve hudprøvene. ‘SC’ kategorien inkluderte prøver av alle teipstrippingene (totalt 5) summert. ‘Reseptorløsning’ kategorien inkluderer absorpsjonsverdien for ¹⁴C-merket testkjemikalie i 1 ml reseptorløsning ganget med det totale volumet av reseptorløsning for hver diffusjonscelle.

Mengde ¹⁴C-triklosan og ¹⁴C-metylparaben i de ulike kategoriene (SC, epidermis og dermis, reseptorløsning, ‘hudvask’ og ‘utstyr’) for hver hudprøve ble beregnet i prosent. Dette ble gjort ved å dele deteksjonsverdien for ¹⁴C-testkjemikaliet i hver kategori på deteksjonsverdien til den positive kontrollen (telleglass som kun inneholdt den samme dosen av ¹⁴C-merket testkjemikalie som ble tilsatt til hver enkel hudprøve).

For å bestemme den totale ¹⁴C-merket testkjemikalie som er blitt gjenvunnet i prosent, ble ifølge EU-kommisjonen (SCCS/1358/10) deteksjonsverdiene for ¹⁴C-merket testkjemikalie i de ulike kategoriene for hver prøve summert og delt på deteksjonsverdien til den positive kontrollen og ganget med 100. Ifølge EU-kommisjonen ligger en godkjent prosent testkjemikalie gjenvunnet mellom 85-115 % (12). Hudprøvene som ikke hadde godkjent

prosent ^{14}C -testkjemikaliet gjenvunnet, ble ekskludert fra videre beregninger for total hudabsorpsjonsverdier.

Dersom kriteriene i retningslinjene er oppfylt, beregnes total hudabsorpsjon som total prosentmengde ^{14}C -testkjemikalie i 'epidermis', 'dermis' og 'reseptorløsning' (gjennomsnitt av summen) lagt til ett standardavvik. I følge EU-kommisjonen er et akseptabelt antall hudprøver 8, fra minst 4 donorer per skadebehandling (12). Dette kriteriet ble ikke møtt ved forsøkene for opptak av ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud, grunnet tekniske problemer som førte til tidsmessige utfordringer. Antall hudprøver per behandling ble derfor mindre enn 8 ved visse forsøk. I opptaksforsøkene som avvek fra retningslinjene ble det derfor lagt til to standardavvik ved beregning av den totale hudabsorpsjonen.

Prosent ^{14}C -testkjemikalie i SC ble ekskludert fra beregningene for totale hudabsorpsjonsverdiene fordi dette laget flasser av naturlig i levende organismen og dermed blir ikke testkjemikaliet tilgjengelig i sirkulasjonssystemet (72, 12). I tillegg kan naturlige sebumutskilling føre til at testkjemikaliet ikke blir absorbert i dypere lagene til huden (12). Total hudabsorpsjonsverdiene for ^{14}C -testkjemikalie på intakt, teipstrippet og rispet hud ble benyttet til beregninger av systemiske eksponeringsdoser (SED) og sikkerhetsmarginer (MoS).

3.5 Kjemikalier i studien

Kjemikalierne som ble brukt i denne studien var ^{14}C -merket triklosan og ^{14}C -merket metylparaben (American Radio-labelled Chemicals Inc. St. Louis, USA). Propylenglykol (Fluka Chemie AG) ble brukt som et løsemiddel til ^{14}C -triklosan. For ^{14}C -metylparaben ble en kommersielt tilgjengelig krem (ApoBase fuktighetskrem, 30 % fett, Apotek1, Norge) brukt som et løsemiddel.

For å løse opp dermis og epidermis ble det brukt SolvableTM (PerkinElmer Inc. Waltham, USA). UltimaGold (PerkinElmer Inc. Waltham, USA) ble brukt som tellevæske. For testing av blandbarhet av løsninger i krem, ble bromfenolblått brukt (Sigma Aldrich Norway AS, Oslo, Norge).

Kravet til løsemidlene som ble brukt til å løse testkjemikalierne var at de mest mulig etterlignet de produkttypene som inneholder testkjemikalierne (12). Propylenglykol ble brukt som et løsemiddel til ^{14}C -triklosan fordi kosmetiske produkter (som håndsåper) som inneholder triklosan, ofte også inneholder propylenglykol (74). ApoBase krem ble valgt som et

løsemiddel for metylparaben fordi metylparaben finnes ofte i kosmetiske produkter som fuktighetskremer. ApoBase krem inneholder da minst mulig kosmetiske ingredienser som kan interferere med forsøkene, i forhold til andre kremer.

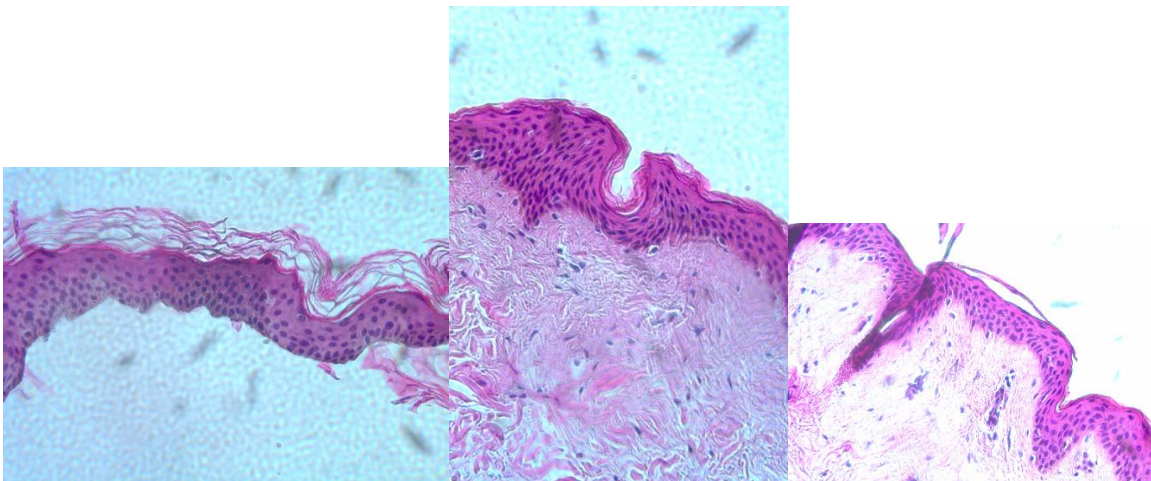
3.6 Metodeutvikling

3.6.1 Skading av stratum corneum

Det ble valgt tre måter å skade hudens SC på; Ved teipstripping, UV-lys og risting i huden med kanyle.

3.6.1.1 Skading av *stratum corneum* ved teipstripping med Scotch-teip

For å kunne oppnå mangel på intercellulære lipider og dermed økning i TEWL på samme måte som tørr hud *in vivo*, ble det bestemt å redusere cellelagene i SC ved teipstripping (16, 18, 19). Faktorene som påvirker teipstripping er blant annet, type teip benyttet, trykket ved påføring av teipen, varighet av trykket og hvor fort teipen fjernes. Det ble valgt å teipstrippe hudprøvene 10 ganger (se kapittel 5.1.3). Det ble brukt 10 3M Scotch Magic teipbiter (Tanum bokhandel, Oslo, Norge). Teipen ble påført med et trykk på ca. 5 kg/m², som varte i 10 sekunder før teipen ble fjernet. Teipen ble fjernet i løpet av 2 sekunder. Trykket ble kontrollert ved å ha hudprøven på en vekt og trykke til 5 kg. Det ble valgt å teipstrippe huden 10 ganger på bakgrunn av en pilotstudie utført på Folkehelseinstituttet (upublisert data). I pilotstudien ble hudprøver teipet 0-20 ganger og deretter visuelt undersøkt i mikroskop. I pilotstudien ble det konkludert med at SC ble helt fjernet etter ca.15-20 gangers teipstripping med Scotch teip, ved et trykk på 5 kg/m² og en varighet på 10 sekunder (figur 6).



Figur 6. Et Bilde av en hudprøve før teipstripping (venstre), et bilde hudprøven etter 15 gangers teipstripping (midten) og et bilde av hudprøven etter 20 gangers teipstripping (høyere).

3.6.1.2 Behandling med UV-lys på hud som har vært frossen

Det ble brukt hud fra en donor (kvinne, 40 år). Hudbiten ble delt i to. Disse bitene var omtrent like når det gjaldt strekkmerker, føflekker, hårinnehold, og andre typer skader. Hudbitene ble

plassert under like betingelser i samme rom (lik temperatur, fuktighet, osv). Den ene hudbiten ble brukt som kontroll og ble ikke eksponert for UV-lys. Den andre hudbiten ble eksponert for bredspektret UVB-stråler med bølgelengder 270-400 nm, ved hjelp av Broadband UVB-lampe (PL-S 9W/12/2P; Philips fra SolRx 100; Solar C Systems). UVB-lampa ble plassert på et stativ slik at avstanden ble 10 cm mellom UV-lampa og hudbiten. Det ble målt TEWL på begge hudbitene før den ene hudbiten ble eksponert for UV-lys (tre ganger på tre ulike områder). Under eksponering av UV-lys, ble det målt TEWL etter 2,4 og 6 timer på både kontroll huden og UV-behandlet hudprøve (3 ganger på hvert område).

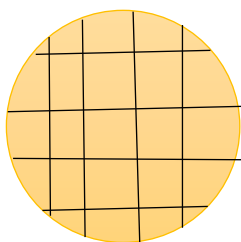
3.6.1.3 Behandling med UV-lys på fersk hud

Fersk hud oppbevart ved 4 °C mellom operasjon og forsøksstart (ca. 15 timer) ble benyttet (donor: kvinne, 44 år). Huden ble delt i to biter, en kontroll (ikke eksponert for UV-lys) og en eksponert for UVB-lys opptil 6 timer. Begge hudbitene ble plassert under like betingelser i samme rom. TEWL ble målt både før og under UVB-bestråling som beskrevet over i kapittel 3.6.1.2.

3.6.1.4 Risping med kanyle.

Et av kjennetegnene til tørr hud er at det dannes sprekke i huden. Sprekkene kan fordype seg ned til blodkapillærene i dermis og forårsake blødning i huden. Dette vil da kunne føre til økning i TEWL (75) som vil føre til et økt opptak av kjemikalier (11, 14). Små kutt/skrubbsår kan også påvirke hudoppak av kjemikalier. Slike sår kan oppstå særlig på hender (14, 76) og på andre hudområder etter barbering (76). For å kunne danne sprekker i huden *in vitro*, kan huden rispes ved hjelp av en kanyle.

Hud fra en donor (kvinne, 35) ble brukt. Områdene på hudprøvene som skulle skades, ble merket med en tusj til en sirkel som tilsvarte et areal som er ca. 1,76 cm². Det ble brukt BD Microlance, 21G hypodermisk kanyle (+Apotek 1 Gruppen AS, Oslo, Norge) med diameter på 0,08 cm og lengde på 4 cm. Hudprøven ble rispet ved å dra kanylen forsiktig gjennom SC-laget, og det ble lagd 1-6 usynlige kryss i det merket hudområdet (figur 7). TEWL ble målt tre ganger etter hvert kryss. Prosedyren fortsatte til TEWL-målingene oppnådde en platå. Det ble bestemt å lage 4 horisontale striper og 4 vertikale striper som et kryss for risping av prøvene ved eksperimentene på opptak av ¹⁴C-triklosan og ¹⁴C-metylparaben på kanyleskadet hud.



Figur 7. Et skissediagram av en rispet hudprøve. Sirkelen representerer merket området på hudprøven og svarte strekene er riftene som ble laget ved hjelp av en kanyle. Det ble laget 4 vertikale og 4 horisontale rifter som krysset hverandre.

3.7 Absorpsjon av triklosan og metylparaben på intakt hud

3.7.1 Korttids hudeksponering for ^{14}C -triklosan

Ti hudprøver fra fire kvinnelige donorer (34-52 år) (2-3 hudprøver fra hver donor) ble brukt. Eksponering med ^{14}C -triklosan ble utført som beskrevet i kapittel 3.3. Hudprøvene ble fuktet med 10 μl reseptorløsning (30 % etanol) og inkubert i ca. 10 minutter før ^{14}C -triklosan ble tilsatt. Dette ble gjort fordi testkjemikaliet fordeler seg bedre utover huden når den er fuktig. Det ble deretter tilsatt 17 μl 0,3 % ^{14}C -triklosan (i propylenglykol) i hver Franz-diffusjonscelle (totalt 10 celler). Etter 20 minutters eksponeringstid, ble ^{14}C -triklosan tørket av med et tørt filterpapir og alle hudprøvene ble forsiktig vasket to ganger med to filterpapir, fuktet med reseptorløsningen. Filterpapirene ble lagt i hvert sitt telleglass (fylt med 4 ml UltimaGold telleveske). Prøvene stod i totalt 24 timer etter påføring av testkjemikaliet.

3.7.2 Langtids hudeksponering for ^{14}C -metylparaben

Det ble brukt ti hudprøver fra fire kvinnelige donorer (34-52 år). Eksponering med ^{14}C -metylparaben ble utført som beskrevet i kapittel 3.3. I en petriskål ble det veid inn 675 mg ApoBase krem ved hjelp av en kalibrert vekt (Mettler Toledo AG64, Oslo). Deretter ble kremen tilført 2 μl ^{14}C -metylparaben (tilsvarende en konsentrasjon på 0,4 %) og blandet inn i kremen ved å bruke 8-blandingsformen, 150 antall ganger. Det ble tilsatt 4,5 mg kremblending på hver hudprøve i Franz cellene ved hjelp av en spatel. Spatelen og veieskipet ble etter hver overføring av ^{14}C -metylparaben i krem, tørket av med hver sitt eget tørt filterpapir og lagt i egne telleglass. Det ble også laget en positiv kontroll hvor 0,4 % ^{14}C -metylparaben i 4,5 gram Apo-Base krem ble overført til et telleglass. Prøvene ble eksponert i 24 timer.

3.8 Eksponering for ^{14}C -triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud

Protokoll for korttids eksponering for ^{14}C -triklosan på intakt, teipskadet og kanyleskadet hudprøver ble utført på samme måte som beskrevet for korttids eksponering for ^{14}C -triklosan på intakt hud (kapittel 3.7.1), med unntak av følgende endringer:

- Det ble brukt tolv hudprøver i eksperimentet (4 intakte, 4 teipskadet og 4 kanyleskadet hudprøver).
- Det ble brukt tre Corneotape biter til å skade fire av hudprøvene før de ble montert på Franz-cellene. Deretter ble det benyttet kun to Corneotape biter i ‘’ separering av hudlagene’’ -s trinnet (kapittel 3.8) for disse prøvene. TEWL ble målt før og etter skading.
- Fire av hudprøvene ble skadet med kanyle (kapittel 3.5.2.3) med TEWL målt før og etter skading.

Optimaliseringer og endringer i prosedyren:

Samme forsøket ble gjentatt, med følgende endringer for optimalisering av prosedyren:

- Det ble brukt ti 3M Scotch teip (i stedet for Corneotape biter) til å teipstrippe fire av hudprøvene (kapittel 3.5.2.1).
- Ved en feiltagelse, ble ikke hudprøvene fuktet med 10 µl 30 % etanol, og derfor ble det brukt en spatel for å spre 17 µl 0,3 % ¹⁴C-triklosan (i propylenglykol) på hudprøvene. Spatelen ble vasket med fuktig filterpapir (ren etanol) etter hver gang den ble brukt til å spre 0,3 % ¹⁴C-triklosan på en hudprøve. Filterpapirene ble telt i scintillasjonstelleren.
- Etter 20-minutters eksponering med ¹⁴C-triklosan i Franz-cellene, ble ¹⁴C-triklosan tørket av med et tørt filterpapir for hver Franz-celle, og hudprøvene ble ikke vasket før etter 24-timers inkubering av Franz-cellene.

3.9 Eksponering for ¹⁴C-metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud

Protokoll for langtids eksponering for ¹⁴C-metylparaben på intakt, teipskadet og kanyleskadet hud ble gjort på samme måte som i langtids eksponering for ¹⁴C-metylparaben på intakt hud med optimalisering av forsøket (kapittel 3.7.2), med noen endringer:

- Det ble brukt tolv hudprøver totalt i eksperimentet (4 intakte, 4 teipskadet og 4 kanyleskadet hudprøver)
- Det ble brukt 10 3M Scotch teip (i stedet for Corneotape biter) til å skade fire av hudprøvene med teip i dette forsøket (kapittel 3.5.2.1). TEWL ble målt før og etter skading av hudprøvene.
- Fire hudprøver ble skadet med kanyle (kapittel 3.5.2.3) med TEWL målt før og etter skading.

3.10 Beregninger av systemiske eksponeringsdoser (SED) og sikkerhetsmarginer (MoS)

SED ble beregnet for å finne totale dosen av kjemikaliet man blir utsatt for fra alle kosmetiske produktene. Verdiene for relative eksponering ved daglige mengde påført for en produktkategori (E_{produkt}) som er basert på kroppsvekten til et menneske, ble brukt til beregning av SED. E_{produkt} verdiene for 'Rinse-off' og 'leave-on' produkter ble hentet fra SCCS Notes of Guidance dokumentet (10-ende revisjonen, 2018) (tabell 1).

Tabell 1. Produkteksponering for beregning av aggregerte eksponeringer for konserveringsmidlene i kosmetikk

Produkt kategori	** E_{produkt} (g/dag)	E_{produkt} mht* kroppsvekt (mg/kg kroppsvekt/dag)
Håndsåpe	0,20	3,33
Dusjsåpe	0,190	2,79
Deodorant	1,50	22,1
Shampoo	0,110	1,51
Hårbalsam	0,04	0,670
Body lotion	7,82	123
Ansiktskrem	1,54	24,1
Håndkrem	2,16	32,7
Hår-styling	0,4	5,74
Foundation	0,51	7,90
Sminke fjerner	0,5	8,33
Leppestift	0,06	0,90
Øye-sminke	0,02	0,330
Maskara	0,025	0,420
Eyeliner	0,005	0,08

*mht: med hensyn til

** E_{produkt} er basert på kroppsvektene til personene som ble brukt i studiene for bestemmelsen av verdiene for E_{produkt} og ikke på default verdien som er 60 kg

SED for triklosan ble beregnet utifra E_{produkt} -verdiene for håndsåpe, dusjsåpe og deodorant, mens for metylparaben ble SED beregnet fra E_{produkt} -verdiene for alle produktene i tabell 1. SED ble da beregnet ved å bruke ligningen for beregning av SED (ligning 1), hentet fra SCCS Notes of Guidance dokumentet (10-ende revisjonen, 2018), og verdiene for totale hudabsorpsjonene for test-kjemikaliene funnet i denne studien.

$$SED = E_{\text{produkt}} * \frac{C (\%)}{100} * \frac{DAP (\%)}{100} \quad \text{ligning 1}$$

Der:

SED (mg/kg bw/dag): Systemisk eksponerings dose

E_{produkt} (mg/kg bw/dag): Relative daglige mengde produktkategori påført huden

C (%): Konsentrasjon av testkjemikaliet i løsningen (kosmetiske produktet) i prosent

DA_p (%): Hudabsorpsjon av test-kjemikalie i prosent av den totale dose test-kjemikalie påført på hudprøvene i henhold til dosen påført i virkeligheten.

Ligning 2 ble brukt for å beregne MoS-verdiene for triklosan eller metylparaben. I denne ligningen inngår SED beregningene samt NOAEL-verdiene for triklosan (12 mg/kg kroppsvekt/dag) og metylparaben (1000 mg/kg kroppsvekt/dag). NOAEL verdiene ble hentet fra ‘Opinion On Triclosan’ dokumentet (SCCP, 2009) og ‘Extended Opinion on the Safety Evaluation of Parabens’ dokumentet (SCCP, 2005).

$$\text{MoS} = \frac{\text{NOAEL}}{\text{SED}} \quad \text{ligning 2}$$

3.11 Statistiske analyser

Statistiske beregninger ble utført ved hjelp av Excel, SPSS Software og manuelle beregninger av visse statistiske metoder. Det ble brukt deskriptiv statistikk (beregning av gjennomsnittsverdier og standardavvik) for å finne gjennomsnittene og variasjoner i absorpsjonsverdiene for hudopptak av kjemikaliene.

For å finne ut om det er en statistisk signifikant forskjell i TEWL-verdiene mellom kontroll og UV-eksponerte hudbitene, ble det benyttet en Mann-Whitney U test som er en ikke-parametrisk versjon av uavhengig t-test, fordi det ble brukt to uavhengige hudbiter der den ene hudbiten ble eksponert for UV-lys mens den andre ble brukt som en kontroll.

Den statistiske metoden som ble brukt til å sammenligne hudabsorpsjon mellom intakt, teip og kanyle skadebehandlinger er Kruskal Wallis test, som er en ikke-parametrisk versjon av en-veis ANOVA test. Denne testen ble benyttet fordi det er lite antall hudprøver (n= 3-4 hudprøver per behandling per testkjemikalie) som gjør det vanskelig å anta at data er tilnærmet normalfordelt. I tillegg ble det brukt hudprøver fra ulike donorer for hver behandling.

3.12 Ethiske forhold

I denne studien ble det benyttet human bukhud fra biobank Dermatox som ble godkjent fra Regionale komiteer for medisinske og helsefaglig forskningsetikk (REK) (Rek ID: 2015/1032) og hvor huddonorene har gitt sine samtykker til bruk av huden til forskning. Bruken av hud for opptak av ¹⁴C-triklosan og ¹⁴C-metylparaben har godkjenning fra REK (REK ID: 2018/2228).

4. Resultater

4.1 UVB-behandling ved ulike tidsintervaller

Tabell 2 viser gjennomsnittlige TEWL-verdier før og 2,4 og 6 timer etter at huden (tint og fersk) ble eksponert for UVB-lys. UVB-bestråling ga ingen økning i TEWL-verdiene, verken for tint eller fersk hud, sammenlignet med kontrollen.

Tabell 2. Gjennomsnitt (G.snitt) og standardavviksverdiene til TEWL målingene til kontroll og UVB-eksponerte hudbiter (n=4,40-44 år, 2 kvinnedonorer). TEWL målingene er gjort før og 2,4 og 6 timer etter UVB-bestråling. Kontrollen ble målt ved de samme tidspunktene.					
Behandling	Tid (t)	*Tint hud		*Fersk hud	
		G.snitt TEWL (g/m ²)	Standardavvik	G.snitt TEWL (g/m ²)	Standardavvik
Kontroll	Før UVB	5,9	0,98	8,8	1,1
	Etter 2 t	4,6	0,86	3,9	0,7
	Etter 4 t	4,3	0,46	3,4	0,5
	Etter 6 t	3,5	0,2	4,0	0,4
UVB-bestrålt	Før UVB	6,5	2,0	9,7	1,0
	Etter 2 t	3,9	0,26	6,8	0,2
	Etter 4 t	3,3	0,49	5,1	0,9
	Etter 6 t	3,2	0,34	5,1	0,5

* Mann Whitney U test: p-verdi > 0,05. TEWL for kontroll versus UVB-eksponert hud etter 6 timers eksponeringstid

4.2 Risping med kanyle og TEWL

Tabell 3 viser TEWL målinger med økt antall rifter i en hudprøve

Tabell 3. TEWL verdier i forhold til antall ganger med risping av en hudprøve (kvinne 35 år)

Antall rifter	TEWL (g/m ²)	Standardavvik
0	4,70	0,10
2	21,40	0,82
4	23,57	2,66
6	25,63	1,76
8	32,17	1,62
10	32,33	2,70
12	30,27	0,55

Før risping var TEWL-verdiene til hudprøven på 4,7 g/m². Etter 2 og 8 rifter, økte TEWL-verdien henholdsvis 4,5 og 8 ganger. Gjennomsnitt TEWL verdier etter 8, 10 og 12 rifter er nesten like. På grunn av dette ble det bestemt å lage 8 rifter i hud ved opptak av ¹⁴C-triklosan og ¹⁴C-metylparaben forsøkene (kapittel 4.6-4.8).

4.3 Gjenvinning og hudabsorpsjon

4.3.1 ¹⁴C-triklosan og ¹⁴C-metylparaben på intakt hud

TEWL verdier for hudprøvene som ble brukt i forsøket for hudopptak av ¹⁴C-triklosan på intakt hud varierte mellom 3,60 ±0,17 og 5,57 ±0,46 g/m². For hudopptak av ¹⁴C-

metylparaben varierte TEWL for hudprøvene mellom $3,83 \pm 0,31$ og $5,83 \pm 0,25$ g/m² (tabell 17 og 18 i vedlegg 8.5.1).

Absorpsjon av ¹⁴C-triklosan og ¹⁴C-metylparaben i de ulike hudlagene (SC, epidermis og dermis), reseptorløsning, 'hudvask', samt total hudabsorpsjon ved forsøkslutt og på utstyret som ble benyttet i forsøkene til hver hudprøve vises i tabell 4 og 5.

Hudprøvene på Franz-cellene C, H og J i tabell 4 viste en prosent gjenvinning som er utenfor det akseptable intervallet (10 ± 15 %), derfor ble de ekskludert fra videre beregninger.

Verdiene for de resterende 7 hudprøvene med godkjent prosent testkjemikalie gjenvunnet, ble brukt til beregningen av totale hudabsorpsjon av ¹⁴C-triklosan på intakt hud. Siden antallet på 7 hudprøver avviker fra antallet hudprøver foreslått av EU-kommisjonen (som er minst 8), ble summen av absorpsjonsverdiene i epidermis (uten SC), dermis og reseptorløsning lagt sammen med to standardavvik.

Den totale hudabsorpsjon av ¹⁴C-triklosan på intakt hud: $9 \% + 2 \cdot 7,3 = 23,6$ %

For ¹⁴C-metylparaben på intakt hud derimot, ble det godkjent prosent testkjemikalie gjenvunnet på alle ti hudprøvene som ble brukt, og dermed ble det et akseptabelt antall hudprøver som ble brukt til beregningen av total hudabsorpsjonsverdi ifølge EU-kommisjonen. Derfor ble summen av absorpsjonsverdiene for ¹⁴C-metylparaben i epidermis (uten SC), dermis og reseptorløsning lagt sammen med ett standardavvik.

Den totale hudabsorpsjon av ¹⁴C-metylparaben på intakt hud: $72 + 6,1 = 78,1$ %

Tabell 4. Prosent absorpsjon av ¹⁴C-triklosan etter 20-minutters eksponeringstid (n=10, 34-52 år, 4 kvinne-donor) i ulike hudlagene, reseptorløsning, 'hudvask', 'utstyr' og ¹⁴C-triklosan gjenvunnet på intakt hud. I tillegg til total hudabsorpsjon, gjennomsnittene i prosent og standardavvikene til alle verdiene.

Hudprøve	SC	Epidermis	Dermis	Reseptorløsning	Hudvask	Utstyr	Gjenvunnet	Tot. absorpsjon
A	1,86	0,52	1,43	3,71	104,37	1,11	113	5,65
B	6,84	1,67	2,96	2,37	83,76	1,52	99	7,00
C	4,27	1,57	2,86	6,97	59,08	2,64	77	-
D	4,76	1,19	0,58	1,82	102,89	1,34	113	3,58
E	4,19	0,91	1,46	2,36	88,16	1,86	99	4,72
F	4,20	0,73	0,51	1,55	92,86	1,74	102	2,79
G	8,70	2,05	1,34	16,44	55,68	2,32	87	19,83
H	8,78	2,66	2,38	5,23	56,40	5,47	81	-
J	5,94	2,41	5,19	4,33	61,31	1,76	81	-
K	9,71	2,82	7,39	9,02	56,17	4,77	90	19,24
Gj.snitt	5,75	1,41	2,24	5,32	83,41	2,10	100	8,97
Std.avvik	2,78	0,82	2,41	5,54	20,17	1,24	10	7,3

Rader merket med rosa representerer opptaksverdiene for hudprøvene som ble ekskludert fra beregninger av gjennomsnitt og standardavvik, grunnet prosent gjenvinning av testkjemikaliet som ikke tilfredstiller det akseptable intervallet for prosent gjenvinning (85-115 %).

*Tot. absorpsjon = epidermis + dermis + reseptorløsning

Tabell 5. Prosent absorpsjon av ¹⁴C-metylparaben etter 24-timers eksponeringstid (n=10, 34-52 år, 4 kvinne-donor) i ulike hudlagene, reseptorløsning, 'hudvask', 'utstyr' og ¹⁴C-metylparaben gjenvunnet på intakt hud. I tillegg til total hudabsorpsjon, gjennomsnittene i prosent og standardavvikene (Std.avvik) til alle verdiene.

Hudprøve	SC	Epidermis	Dermis	Reseptorløsning	Hudvask	Utstyr	Gjenvunnet	Tot. absorpsjon
A	0,65	0,78	1,14	74,78	1,96	11,70	91	76,65
B	0,46	0,55	1,36	75,28	0,18	11,70	88	77,18
C	1,08	1,53	1,33	65,64	1,46	14,05	85	68,48
D	0,34	0,63	2,44	57,71	0,34	23,27	85	60,72
E	0,44	0,50	0,85	62,08	0,43	22,15	86	63,30
F	0,42	1,01	2,02	75,03	0,69	8,00	87	78,00
G	2,59	2,34	4,38	67,77	2,91	11,59	92	74,50
H	1,05	1,28	5,94	70,40	1,85	12,43	93	77,53
I	1,20	4,06	19,22	50,07	3,23	13,71	91	73,23
J	0,73	0,91	1,57	67,86	1,61	15,62	88	70,31
Gj.snitt	0,90	1,36	4,03	66,66	1,47	14,42	89	71,99
Std.avvik	0,67	1,10	5,58	8,19	1,07	4,81	3	6,1

*Total absorpsjon = epidermis+dermis+reseptorløsning

Verdiene for total hudabsorpsjon for ¹⁴C-triklosan og ¹⁴C-metylparaben på intakt hud

(henholdsvis 23,6 % og 78,1 %) fra disse forsøkene ble ikke brukt til beregninger av SED og MoS, grunnet forskjeller mellom dem og verdiene oppnådd i forsøkene med intakt og skadet hud.

4.3.2 ¹⁴C-triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud (forsøk 1)

TEWL verdiene for hudprøvene varierte mellom 2,63 ±0,45 og 3,77 ±0,21 g/m² før skading av huden og mellom 3,33 ±0,15 og 49,27 ±0,93 g/m² etter skading av huden (tabell 19 og 20, vedlegg 8.5.2). Teipstripping med 3 Corneotape biter, ga liten økning i TEWL. Det ble derfor bestemt å bruke 10 biter Scotch Magic tape for teipstripping i de neste forsøkene (vedlegg 8.5.3 og 8.5.4).

Tabell 6 viser prosent absorpsjon ¹⁴C-triklosan i de ulike hudlagene (SC, epidermis og dermis), reseptorløsning, 'hud vask', 'utstyr', samt total hudabsorpsjon for hver hudprøve i forsøk 1.

Tabell 6. Forsøk 1: Prosent absorpsjon av ¹⁴C-triklosan etter 20-minutters eksponeringstid (n=12, 29-46 år, 4 kvinnedonorer) i de ulike hudlagene, reseptorløsning (R.L), 'hudvask', 'utstyr' og ¹⁴C-triklosan gjenvunnet på intakt hud, teipstrippet og rispet hud. I tillegg til total hudabsorpsjon, gjennomsnittet (Gj.snitt) og standardavviket (Std.avvik) ved hver (skade)behandling.

Behandling	SC	Epidermis	Dermis	R.L	Hud vask	Utstyr	Gjenvunnet	Tot. absorpsjon* #
Kontroll	2,4	0,4	0,7	1,4	115,0	1,1	121	3
Kontroll	1,7	0,3	0,2	0,5	104,7	0,1	108	1
Kontroll	9,3	2,5	3,9	4,0	81,2	1,8	96	10
Kontroll	4,7	2,3	0,9	2,2	91,5	1,2	100	5
Gj.snitt	5,2	1,69	1,67	2,23	92,4	1,1	101	5,6
Std.avvik	3,8	1,24	1,96	1,72	11,8	0,87	5,8	4,7
Teipstrippet	0,5	0,4	0,4	1,2	98,7	0,1	101	2
Teipstrippet	2,0	5,5	5,0	14,9	87,9	0,5	116	25
Teipstrippet	0,5	0,6	0,3	0,1	109,7	0,0	110	1
Teipstrippet	1,8	3,1	0,8	0,4	90,9	0,1	93	4
Gj.snitt	0,93	1,37	0,49	0,58	99,8	0,094	101	2,4
Std.avvik	0,76	1,50	0,25	0,59	9,5	0,05	8,6	1,6
Rispet	3,0	1,3	2,3	7,3	98,4	0,1	112	11
Rispet	2,8	3,1	4,3	3,0	92,8	3,3	109	10
Rispet	4,4	1,3	2,3	0,4	86,6	0,0	91	4
Rispet	3,9	2,6	3,7	1,8	96,0	0,2	102	8
Gj.snitt	3,5	2,09	3,15	3,14	93,4	0,91	104	8,4
Std.avvik	0,77	0,91	0,99	2,97	5,1	1,6	9,4	3,2

* Sammenligning optak av ¹⁴C-triklosan mellom intakt, teipstrippet og rispet hud (Kruskal-Wallis: p-verdi > 0,05 = ingen statistisk signifikant forskjell)

#Tot.absorpsjon= epidermis + dermis + reseptorløsning.

Rosa cellemerking representerer optaksverdiene for hudprøvene som ble ekskludert fra beregninger av gjennomsnitt og standardavvik, grunnet prosent gjenvinning av testkjemikaliet som ikke tilfredstiller det akseptable intervallet for prosent gjenvinning (85-115 %).

Total hudabsorpsjon av ¹⁴C-triklosan ble beregnet til å være:

$$5,6 \% + 2 \cdot 4,7 = 15,0 \% \text{ på intakt hud}$$

$$2,4 \% + 2 \cdot 1,6 = 5,6 \% \text{ på teipstrippet hud}$$

$8,4 \% + 2 \cdot 3,2 = 14,8 \%$ på rispet hud

Disse beregnede total hudabsorpsjonsverdiene ble benyttet til beregning av systemiske eksponeringsdosene (SED) og sikkerhetsmarginene (MoS) for triklosan på intakt og rispet hud, grunnet godkjente prosent testkjemikalie gjenvunnet. Den totale hudabsorpsjonsverdien for ^{14}C -triklosan på teipstrippet hud ble lavere enn verdien for intakt hud, derfor ble denne verdien ikke benyttet til beregningene av SED og MoS. Se kapittel 3.12

4.3.3 ^{14}C -triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud (forsøk 2).

TEWL-verdiene før skading av huden varierte mellom $3,8 \pm 0,3$ og $5,8 \pm 0,4 \text{ g/m}^2$. etter skading av huden varierte TEWL fra $7,7 \pm 0,8$ til $46,5 \pm 1,4 \text{ g/m}^2$ (tabell 21 og 22, vedlegg 8.5.3).

Absorpsjon av ^{14}C -triklosan i de ulike hudlagene (SC, epidermis og dermis), reseptorløsning, 'hudvask', 'utstyr', samt total hudabsorpsjon for de ulike hudprøvene vises i tabell 7.

Prosent mengde ^{14}C -triklosan gjenvunnet i alle hudprøvene ikke tilfredsstillende grenseverdien $100 \pm 15 \%$. Prosent total hudabsorpsjonen for ^{14}C -triklosan viste en tendens til å øke på skadet hud, men økningen ikke var ikke statistisk signifikant.

Total hudabsorpsjon av ^{14}C -triklosan ble beregnet til å være:

$16 \% + 2 \cdot 6,5 = 29,0 \%$ på intakt hud

$27 \% + 2 \cdot 8,2 = 43,4 \%$ på teipstrippet hud

$28 \% + 2 \cdot 5,1 = 38,2 \%$ på rispet hud

Tabell 7. Forsøk 2: Prosent absorpsjon av ¹⁴C-triklosan etter 20-minutters eksponeringstid (n=12, 29-46 år, 4 kvinnedonor) i de ulike hudlagene, reseptorløsning (R.L.), 'hudvask', 'utstyr' og ¹⁴C-triklosan gjenvunnet på intakt hud og skadet hud. I tillegg til total hudabsorpsjon, gjennomsnittet (Gj.snitt) og standardavviket (Std.avvik) ved hver (skade)behandling.

Behandling	SC	Epidermis	Dermis	R.L.	Hud vask	Utstyr	Gjenvunnet	Tot. absorpsjon*#
Intakt	8,0	12,6	1,0	4,7	25,7	4,6	56,6	18,3
Intakt	4,7	2,7	4,1	8,0	25,3	0,4	45,2	14,8
Intakt	7,0	1,6	2,9	2,6	35,5	10,4	60,0	7,0
Intakt	4,2	5,7	12,0	4,5	16,8	3,7	47,0	22,2
Gj.snitt	6	5,6	5,0	4,9	26	5	52	16
Std.avvik	1,82	4,96	4,8	2,2	7,6	4,2	7,2	6,5
Teipstrippet	1,1	3,6	7,3	19,0	21,4	4,2	56,6	30,0
Teipstrippet	5,8	3,8	9,4	14,0	14,6	2,1	49,6	27,2
Teipstrippet	4,8	2,3	6,5	6,9	28,0	6,2	54,7	15,7
Teipstrippet	1,8	4,2	18,5	12,6	11,9	0,9	49,9	35,3
Gj.snitt	3	3,5	10,4	13,1	19	3	53	27
Std.avvik	2,27	0,81	5,5	5,0	7,2	2,3	3,5	8,2
Rispet	2,3	4,7	12,4	16,1	13,2	1,3	50,0	33,2
Rispet	6,0	5,0	9,5	14,2	22,0	2,6	60,2	28,7
Rispet	9,1	8,9	0,5	11,6	19,0	3,7	52,7	20,9
Rispet	4,9	5,0	11,3	11,2	20,9	2,4	55,7	27,5
Gj.snitt	6	5,9	8,4	13,2	19	2	55	28
Std.avvik	2,81	2,0	5,4	2,3	3,9	1,0	4,4	5,1

* Sammenligne opptak av ¹⁴C-triklosan mellom intakt, teipstrippet og rispet hud (Kruskal-Wallis: p-verdi > 0,05 = ingen statistisk signifikant forskjell)

#Tot. absorpsjon = epidermis + dermis + reseptorløsning

4.3.4 ¹⁴C-metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud

TEWL-verdiene for hudprøvene som ble brukt i dette forsøket varierte mellom $3,8 \pm 0,12$ og $5,8 \pm 0,12$ før skading av huden og mellom $6,9 \pm 0,4$ og $37,6 \pm 2,13$ etter skading av huden (tabell 23 og 24 i vedlegg 8.5.4).

Prosent absorpsjon av ¹⁴C-metylparaben i de ulike hudlagene, reseptorløsning, 'hudvask', 'utstyr' og totale hudabsorpsjon for alle hudprøvene samt prosent ¹⁴C-metylparaben gjenvunnet vises i tabell 8.

Den totale hudabsorpsjon av ¹⁴C-metylparaben ble beregnet til å være:

$78 \% + 2 * 4,7 = 87,4 \%$ på intakt hud

$78 \% + 2 * 14,7 = 107,4 \%$ på teipstrippet hud

$87 + 2 * 19,7 = 126,4 \%$ på rispet hud

Disse verdiene ble brukt til beregning av SED og MoS på intakt og skadet hud. Siden prosent totale hudabsorpsverdiene for ¹⁴C-metylparaben på teipstrippet og rispet hud økte til over 100 %, ble disse verdiene ikke brukt i beregninger av SED og MoS fordi ved reelle

eksponeringsscenarioene kan hudabsorpsjonen ikke overstige 100 %. For beregninger av SED og MoS for metylparaben på teipstrippet og rispet hud, ble det dermed bestemt å bruke 100 % verdien i stedet. Teipstrippet og rispet hud ble slått sammen til skadet hud.

Tabell 8. Prosent absorpsjon av ¹⁴C-metylparaben etter 24-timers eksponeringstid (n=12, 37-68 år, 4 kvinnedonorer) i de ulike hudlagene, reseptorløsning (R.L.), 'hudvask', 'utstyr' og ¹⁴C-metylparaben gjenvunnet på intakt hud og skadet hud. I tillegg til total hudabsorpsjon, gjennomsnittene i prosent og standardavvikene til alle verdiene. Gjennomsnitt (Gj.snitt) og standardavvik (Std.avvik) for hver skadebehandling ble beregnet.

Behandling	SC	Epidermis	Dermis	R. L.	Hudvask	Utstyr	Gjenvunnet	Tot. absorpsjon*#
Intakt	2	2	2	69	5	18	99	74
Intakt	2	1	1	70	0	10	82	72
Intakt	2	2	6	70	2	8	89	78
Intakt	1	1	2	80	1	15	100	83
Gj.snitt	1,6	1,7	3,4	73	2,50	13	96	78
Std.avvik	0,82	0,79	2,3	6,1	2,1	5,4	5,8	4,7
Teipstrippet	0	0	2	76	0	11	89	77
Teipstrippet	0	0	1	65	0	25	91	66
Teipstrippet	0	0	1	69	0	26	96	70
Teipstrippet	0	0	2	97	0	10	110	99
Gj.snitt	0,11	0,33	1,2	77	0,27	18	97	78
Std.avvik	0,04	0,12	0,44	14,3	0,06	8,6	9,3	14,7
Rispet	0	0	1	88	0	4	93	89
Rispet	0	0	1	104	0	7	114	106
Rispet	0	1	4	88	1	25	120	94
Rispet	0	1	1	65	0	28	96	67
Gj.snitt	0,18	0,45	1,2	86	0,35	13	101	87
Std.avvik	0,11	0,09	0,13	19,4	0,02	13,3	11,0	19,4

*Sammenligne opptak av ¹⁴C-metylparaben mellom intakt, teipstrippet og rispet hud (Kruskal-Wallis: p-verdi > 0,05 = ingen statistisk signifikant forskjell)

#Tot.absorpsjon= epidermis + dermis + reseptorløsning

Rosa cellemerking representerer opptaksverdiene for hudprøvene som ble ekskludert fra beregninger av gjennomsnitt og standardavvik, grunnet prosent gjenvinning av testkjemikaliet som ikke tilfredstiller det akseptable intervallet for prosent gjenvinning (85-115 %).

4.4 Beregning av systemiske eksponeringsdoser (SED) og sikkerhetsmarginer (MoS) for triklosan og metylparaben etter henholdsvis 20-minutters og 24-timers eksponeringstid

For å beregne systemiske eksponeringsdosene (SED) for triklosan og metylparaben, ble prosent absorpsjonsverdiene fra forsøkene med godkjent mengde gjenvunnet (i henhold til EU-kommisjonen og OECD retningslinjene) brukt. Verdiene for de totale hudabsorpsjonsverdiene som ble funnet for ¹⁴C-triklosan (forsøk 1) (15,0 % for intakt hud, og 14,8 % for rispet hud) og ¹⁴C-metylparaben (87,4 % for intakt hud og 100 % for skadet hud), og ligningen for beregning av SED, hentet fra SCCS 'Notes of Guidance' dokumentet (2018)

(ligning 1), i tillegg til verdiene for relative eksponering ved daglig mengde påført for hver produkt kategori (tabell 1) ble benyttet til beregning av SED-verdiene.

Tabell 9, 10 og 11 viser verdiene for relative eksponeringen ved daglige mengdene påført for hver produktkategori og beregnet SED verdiene for triklosan (intakt og rispet hud) og metylparaben (intakt og skadet hud).

Tabell 9. Verdier for relative daglig eksponering for produktene (E_{produkt}), tillatt konsentrasjon av triklosan i kosmetikk, total hudabsorpsjon (%) og beregnet systemisk eksponeringsdoser (SED) på intakt og rispet hud

Produkt type	E_{produkt} (mg/kg kroppsvekt/dag)	Tillatt konsentrasjon triklosan (%)	Totale hudabsorpsjon triklosan (%)	*SED (mg/kg kroppsvekt/dag)
Hånd såpe (intakt)	3,33	0,3	15,0	0,00150
Dusj gel (intakt)	2,79	0,3	15,0	0,00126
Deodorant (roll-on) (intakt)	22,1	0,3	15,0	0,00994
Hånd såpe (rispet)	3,33	0,3	14,8	0,00148
Dusj-gel (rispet)	2,79	0,3	14,8	0,00124
Deodorant (roll-on) (rispet)	22,1	0,3	14,8	0,00980

Tabell 10. Intakt hud. Verdier for relative daglig eksponering for produkter (E_{produkt}), tillatt konsentrasjon av metylparaben i kosmetikk, total hudabsorpsjon og beregnet systemiske eksponeringsdoser (SED)

produkt-kategori	E_{produkt} mht kroppsvekt (mg/kg kroppsvekt/dag)	Tillatt konsentrasjon metylparaben (%)	Total hudabsorpsjon (%)	*SED (mg/kg kroppsvekt/dag)
Håndsåpe	3,33	0,4	87,4	0,0116
Dusjsåpe	2,79	0,4	87,4	0,0098
Deodorant	22,1	0,4	87,4	0,0772
Shampoo	1,51	0,4	87,4	0,0053
Hårbalsam	0,670	0,4	87,4	0,0023
Body lotion	123	0,4	87,4	0,4307
Ansiktskrem	24,1	0,4	87,4	0,0844
Håndkrem	32,7	0,4	87,4	0,1143
Hår-styling	5,74	0,4	87,4	0,0201
Foundation	7,9	0,4	87,4	0,0276
Sminke fjerner	8,33	0,4	87,4	0,0291
Lepestift	0,9	0,4	87,4	0,0031
Øye-sminke	0,33	0,4	87,4	0,0012
Maskara	0,42	0,4	87,4	0,0015
Eyliner	0,08	0,4	87,4	0,0003
Aggregert eksponering	234,12	0,4	87,4	0,8185

mht: med hensyn til

Tabell 11. Skadet hud. Verdier for relative daglie eksponering for produkter (E_{produkt}), tillatt konsentrasjon av metylparaben i kosmetikk, totale hudabsorpsjonene og beregnet systemiske eksponeringsdoser (SED).

Produkt kategori	E_{produkt} mht kroppsvekt (mg/kg kroppsvekt/dag)	Tillatt konsentrasjon metylparaben (%)	Total hudabsorpsjon (%)	SED (mg/kg kroppsvekt/dag)
Håndsåpe	3,33	0,4	100	0,0133
Dusjsåpe	2,79	0,4	100	0,0112
Deodorant	22,08	0,4	100	0,0883
Shampoo	1,51	0,4	100	0,0060
Hårbalsam	0,67	0,4	100	0,0027
Body lotion	123,2	0,4	100	0,4928
Ansiktskrem	24,14	0,4	100	0,0966
Håndkrem	32,7	0,4	100	0,1308
Hår-styling	5,74	0,4	100	0,0230
Foundation	7,9	0,4	100	0,0316
Sminke fjerner	8,33	0,4	100	0,0333
Leppestift	0,9	0,4	100	0,0036
Øye-sminke	0,33	0,4	100	0,0013
Maskara	0,42	0,4	100	0,0017
Eyliner	0,08	0,4	100	0,0003
Aggregert eksponering	234,12	0,4	100	0,9365

mht: med hensyn til

Ved å bruke SED-verdiene (fra tabell 9, 10 og 11), NOAEL-verdiene 12 mg/kg kroppsvekt/dag for triklosan (hentet fra SCCP 2009) og 1000 mg/kg kroppsvekt/dag for metylparaben (hentet fra SCCP 2005), og ligningen for kalkulering av MoS (ligning 2) ble MoS for aggregerte eksponeringene for triklosan (intakt og rispet hud) og metylparaben (intakt og skadet hud) i de ulike produktkategoriene beregnet (tabell 12 og 13).

Tabell 12. Verdier for systemiske eksponeringsdoser (SED) og beregnet sikkerhetsmargin (MoS) for hver produkttype og aggregerte eksponeringen for triklosan på intakt og rispet hud

Produkt type	SED (mg/kg kroppsvekt/dag)	Sikkerhetsmargin (MoS)*
Triklosan i håndsåpe (intakt)	0,00150	8008
Triklosan i dusj-gel (intakt)	0,00126	9558
Triklosan i deodorant (roll-on) (intakt)	0,00994	1208
Aggregert eksponering for triklosan (intakt)	0,01269	946
Triklosan i håndsåpe (rispet)	0,00148	8116
Triklosan i dusj-gel (rispet)	0,00124	9687
Triklosan i deodorant (roll-on) (rispet)	0,00980	1224
Aggregert eksponering for triklosan (rispet)	0,01252	958

*MoS= NOAEL/SED

Tabell 13. Verdier for systemiske eksponeringsdosene (SED) og beregnet sikkerhetsmargin (MoS) for aggregerte eksponeringen av metylparaben på intakt og skadet hud

Produkt type	SED (mg/kg kroppsvekt/dag)	Sikkerhetsmargin (MoS)*
Aggregert eksponering for meylparaben (intakt hud)	0,818	1222
Aggregert eksponering for meylparaben (skadet hud)	0,936	1068

*MoS=NOAEL/SED

Resultatene viser at MoS til aggregerte eksponeringer for triklosan i kosmetikk er ca. 10 ganger høyere enn grenseverdien for MoS (som er 100) ved både intakt og rispet hud (tabell 12). Det er ingen forskjeller av betydning for de to MoS-verdiene (946 og 958 for henholdsvis intakt og skadet hud).

Resultatene viser at MoS for aggregerte eksponeringer av metylparaben på intakt og skadet hud er ca. henholdsvis 12 og 11 ganger høyere enn grenseverdien for MoS som er 100 (tabell 13).

5. Diskusjon

5.1 Metodeutvikling og metodiske hensyn

5.1.1 Testing av reseptorløsninger

Av reseptorløsningene som ble testet i Franz-diffusjonscellesystemet ga 30 % etanol i vann en optimal løselighet for ^{14}C -triklosan og 0,9 % natriumklorid (NaCl) for ^{14}C -metylparaben (vedlegg 8.1).

For å finne reseptorløsningen som kan gi optimale absorpsjonsverdier ble det valgt ulike reseptorløsninger for å finne hvilken reseptorløsning som test-kjemikaliene løser seg best i og som samtidig egner seg til bruk i hudmodellen. Reseptorløsningene som ble valgt for begge test-kjemikaliene (^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben) var destillert vann (H_2O) alene, og destillert vann tilsatt 0,9 % NaCl (fysiologisk saltvann), 30 %, 50 % eller 70 % etanol. De to førstnevnte ble valgt fordi de er vandige løsninger, og vandige løsninger er godt egnet til moderat lipofile test-kjemikalier som ^{14}C -metylparaben (7), i tillegg til at de best mimikerer fysiologiske forhold i kroppen. ^{14}C -triklosan er lipofil og løser seg godt i organiske løsninger som etanol (7, 15). I tillegg er testkjemikaliene godt løselige i etanol (over 100 g triklosan/ 100 g 70-90 % etanol og 52 g metylparaben/ 100 g 70-90 % etanol) (47, 58). I følge EU-kommisjonen skal ikke reseptorløsningen interferere med opptaket av testkjemikaliene (12). Etanol i høye konsentrasjoner kan endre hudstrukturen. For å få resultater som kun viser effektene av de valgte hudbehandlingene på hudopptak av ^{14}C -merket testkjemikaliene, er det ikke ønskelig å bruke høye konsentrasjoner av etanol for å ikke interferere med resultatene (7). Enkelte studier indikerer at 50 % etanol i vann som reseptorløsning kan øke hudopptaket av kjemikalier (77-79). Thors et.al (2016) fant ingen signifikant forskjell i hudopptak mellom hudprøvene som hadde 33 % etanol, 11 % etanol og destillert vann som reseptorløsninger i Franz diffusjonscellesystemet (80). Minste konsentrasjon av etanol (30 %) ble derfor benyttet i denne studien. Sammenlignet med tidligere studier på hudopptak av ^{14}C -triklosan utført ved Folkehelseinstituttet (81), var opptaket av ^{14}C -triklosan høyere ved bruk av 30 % etanol (kapittel 4.5.2) enn ved bruk av fysiologisk saltvann som reseptorløsning (hhv $8,97 \% \pm 7,34$ og $2,06 \% \pm 2,02$). Dette indikerer at 30 % etanol som reseptorløsning kan gi et bedre bilde av hudopptaket av ^{14}C -triklosan ved at den gir en bedre løselighet av testkjemikaliene i reseptorløsningen.

For ^{14}C -metylparaben ga fysiologisk salt vann beste deteksjonsverdier etter 24-timers eksponeringstid, sammenlignet med de andre reseptorløsningene brukt i denne studien (31,6 % ved fysiologisk saltvann, 27,2 % ved H_2O , 6,8 % ved 30 % etanol, 22,7 % ved 50 % etanol

og 11,2 % ved 70 % etanol. Dette indikerer at ^{14}C -metylparaben løser seg best i vandige reseptorløsninger. Dette kan skyldes at ^{14}C -metylparaben ($\text{Log } P_{\text{ow}} 1,96$) er svak lipofil og løser seg bedre i vandige løsninger (7).

5.1.2 Eksponering for UVB-lys

I denne studien var det et ønske om å undersøke ulike mekanismer for skading av hud; fysisk skading ved hjelp av teipstripping og kanylerisping og fysiologisk ved hjelp av UV-lys. Langvarige utsettelse av hud for UV-stråler (særlig UV-B) er kjent for å solbrenne huden, og kan dermed føre til nedsatt barrierefunksjon (14, 15).

Da frossen hud ble eksponert for UVB-lys, ble TEWL verdiene ikke påvirket (ingen statistisk signifikant forskjell mellom ueksponert og eksponert hud, p -verdi $> 0,05$). Dette kan tyde på at hudintegriteten til *ex vivo* tint hud ikke ble endret av UVB-behandling. Bronaugh og Stewart (1985) mener at eksperimenter på effekt av UV-eksponering på hudbarrieren ikke kan utføres *in vitro*, grunnet fysiologiske reaksjoner som skjer i levende hud og ikke i død hud (76). Siden frossen hud, i motsetning til fersk hud ikke er metabolsk aktiv, ble forsøket derfor gjentatt på fersk hud, men ingen statistisk signifikant forskjell i TEWL-verdiene mellom ueksponert og eksponert hud (6 timers UVB bestråling) ble observert (p -verdi $> 0,05$). Disse funnene støttes av Moody og Martineau (82) som, i en *in vitro* (flow-through) modell, brukte UV-lys med bølgelengde 200-400 nm til å bestråle både tint og fersk human hud i 24 timer, ved samtidig eksponering for ^{14}C -N,N-Dietyl-m-Toluamid. Moody og Martineau fant da ingen statistisk signifikant forskjell i hudopptaket av testkjemikaliet mellom bestrålt og ikke-bestrålt hud. Disse resultatene kan tyde på at integriteten for *ex vivo* hud ikke påvirkes av UV-behandling. Dette indikerer at UVB-lys hemmer og induserer visse cellulære prosesser (29, 36, 37) *in vivo* som ikke oppstår ved hud som har vært frossen og heller ikke fersk hud. Ved UV-eksponering *in vivo* tar det ca. 3 til 5 timer til huden blir solbrent (29). TEWL-verdiene til både kontroll og UVB-eksponerte hudbitene minket etter hvert som de sto ved romtemperatur. Dette skyldes at hudbitene ble akklimatisert og at dette i seg selv vil kunne påvirke TEWL-verdiene. Siden UVB-lys ga ingen effekt på TEWL-verdiene, ble denne skadebehandlingen valgt bort fra opptak av ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben i denne studien.

For å teste om UV-eksponeringen har en effekt på hudopptak av kjemikalier har Solomon et al. (83) og Bronaugh og Stewart (1985) (76) utsatt hårløse mus og barberte rotter for UV-lys før avliving og brukt dyrehuden i eksperimentene for hudopptak av kjemikalier. En mulig måte å teste hudopptaket av kjemikalier på UV-bestrålt hud er å bestråle huden som skal fjernes fra kroppen før operasjonen. Et slikt forsøk vil derimot kunne være praktisk og etisk

utfordrende. Huden benyttet i denne studien ble fjernet fra pasienter ved allerede planlagte kosmetiske operasjoner hvor det opprinnelige formålet ikke var forskning. Flere timers UV-belysning av huden vil kunne påvirke hudens integritet og dermed også resultatet av selve operasjonen. I tillegg vil klinikken måtte endre sine timeavtaler for å få tid til UV-bestråling før selve inngrepet.

5.1.3 Teipstripping

Teipstripping er metoden som brukes ofte når det undersøkes hudopptak av kjemikalier på skadet hudbarriere (14). Denne metoden er minst mulig skadelig og er billig (14, 15). Per i dag er det utfordrende å lage en standardisert protokoll for teipstripping av huden, grunnet mange faktorer som påvirker teipstripping, som type teip brukt, trykket påført på huden ved teipstripping, varigheten av trykket påført, hastigheten på fjerning av teipen og tykkelsen på SC som igjen er avhengig av lokasjon av hudområdet i kroppen, hudalder, kjønn og kanskje rase (10, 15).

Basert på en pilotstudie, gjort på Folkehelseinstituttet, ble det først konkludert med at SC fjernes fullstendig ved bruk av 5 Corneotape biter. Personer med tørr hud og hudsykdommer som AD, psoriasis, har fortsatt SC celledag, men celledagene ikke er like intakte som frisk hud (18, 20). Derfor ble det bestemt at antall ganger med teipstripping med Corneotape biter ikke skal overskride 3 ganger slik at deler av SC fortsatt er tilstede på hudprøvene.

I første forsøket med opptak av ^{14}C -triklosan på intakt, teipskadet og kanyleskadet hud (vedlegg 8.2.1), ble det ikke en økning i TEWL-verdier etter teipstripping sammenlignet med intakt hud. Dette kan skyldes at tre gangers teipstripping med Corneotape biter ikke var tilstrekkelig til å skade SC slik at det ga utslag på TEWL-målingene. Skading av SC i dette prosjektet ble derfor basert på en tidligere utført pilotstudie på teipstripping med 3M Scotch teip (kapittel 3.5.2.1). I pilotstudien ble tykkelse på SC undersøkt mikroskopisk, og det ble konkludert at 15-20 gangers teipstripping var nok til å fjerne hele SC fra hudprøvene. Da det var ønskelig å kun redusere SC og ikke fjerne den helt, ble hudprøvene strippet ti ganger med 3M Scotch biter i neste forsøkene for opptak av ^{14}C -testkjemikaliene på teipskadet hud. 3M Scotch teip ble brukt fordi denne type teip er billigere i forhold til Corneotape. Ved å bruke Scotch teip til teipstripping av huden, ble det to til tre gangers økning i TEWL i forhold til intakt hud (vedlegg 8.5.3 og 8.5.4). Siden det er færre intercellulære lipider mellom korneocytene i SC hos personer med AD, psoriasis eller tørr hud, kan disse personene ha tre til ti ganger høyere TEWL i forhold til personer med normal hud (14, 18, 84). Det vil si at teipstripping 10 ganger med 3M Scotch teipbiter kan være en god metode for å predikere

opptak av kjemikalier på skadet hud. Dette stemmer med konklusjonen til Heylings et. al som var at 10 gangers teipstripping med Corneotape ved et trykk på 225 g/cm^2 førte til 3-4 gangers økning i TEWL i forhold til intakt hud, og dette antallet var dermed god til å mimikere skadet hudbarrieren til personer med AD og psoriasis *in vivo* (84).

5.1.4 Risping

For å oppnå en *ex vivo* hudmodell som ligner på syk eller skadet hud *in vivo* (f.eks. eksemhud, tørr hud og skrubbsår), ble det bestemt å rispe huden med kanyle. Risping av hud i denne studien førte til 4-8 gangers økning i TEWL i forhold til intakt hud. Denne økningen i TEWL kan derfor representere syk eller skadet hud *in vivo* som kan ha opptil 10 ganger høyere TEWL-verdier enn frisk hud (14). Sammenlignet med andre rispingsteknikker er bruk av kanyle til risping en enkel metode for å skade huden på. I tillegg ligner sprekkene som ble dannet ved kanylerisping, på sprekkene som oppstår i huden ved skrubbsår og AD pasienter. Ulempen med denne metoden er at den er ustandardisert. Det kan være vanskelig å kontrollere dybden på skaden av SC. Derfor ble det variasjoner i dybden mellom riftene som ble laget i hudprøvene, og dette vises ved variasjoner i TEWL-verdiene (vedlegg 8.5.2, 8.5.3 og 8.5.4). Schlupp et. al (2014) brukte en svamp dekket med aluminium til risping av huden med kontinuerlige målinger av TEWL (14). De satte en grenseverdi for TEWL på 30 ± 2 for å få en mest mulig lik grad av skade på SC (14). I fremtidige forsøk kan dette være en måte å standardisere kanyleskademethoden på. Akomeah et. al har også brukt en standardisert metode til å rispe huden med. Der brukte de en roterende bust børste med en konstant behandlingstid på 45 sekunder (87). Ved bruk av roterende bust børste og aluminiumdekket svamp til risping av hud, kan det oppnås en jevn dybde på skaden av SC, i tillegg vil kun SC laget blir skadet mens hudlagene som ligger under SC ikke blir påvirket (14, 87). I motsetning av kanylerisping hvor dybden på skaden av SC blir forskjellig mellom riftene på hudprøven og hvor underliggende lagene (levende epidermis og dermis) også blir påvirket. Roterende bust børste og aluminiumdekket svamp kan være bedre alternativer til risping enn kanyleskadebehandling da dybden på skaden kan bedre standardiseres og kontrolleres.

5.1.5 Løsemiddel

Hensiktene med løsemidlene er at de skal kunne reflektere de produkttypene hvor kjemikaliene brukes (12, 72, 91). I denne studien ble det benyttet propylenglykol og ApoBase krem til henholdsvis ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben. Propylenglykol ble brukt siden den er ofte brukt i kosmetikk, særlig i såpeprodukter (74), men propylenglykol kan i seg selv påvirke hudopptaket. Det er flere studier som har tydet på at propylenglykol kan gi et økt hudopptak

av kjemikalier både *in vitro* og *in vivo* (1, 7, 74, 92). Fang et. al har sammenlignet opptak av ^{14}C -triklosan (10 mg/kg kroppsvekt) i propylenglykol, 95 % etanol og vannbasert fuktighetskrem på mus *in vivo*. Det ble funnet at opptaket av ^{14}C -triklosan var lavest når propylenglykol var brukt som et løsemiddel (3,865 \pm 289 %/time for propylenglykol vs. 5,747 \pm 127 %/time for 95 % etanol og 5,827 \pm 72 %/time for fuktighetskrem) (93). Det er også en studie som indikerer at propylenglykol i små appliseringsvolum ikke påvirker hudopptak av lipofile kjemikalier. Hilton et. al sammenlignet hudopptak av tre kjemikalier med ulike grad lipofilisitet, i tre løsemidler som er brukt i kosmetikk (oktanol, etyldekanooat og propylenglykol) på human hud *in vitro*. For testkjemikaliet Fluazifop-butyl med tilnærmet lik partisjonskoeffisient og molekylvekt med triklosan, ble det funnet at hudopptaket økte mest med propylenglykol sammenlignet med oktanol og etyldekanooat (0,39 \pm 0,07 vs. 0,099 \pm 0,02 og 0,064 \pm 0,007 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{time}$) ved et appliseringsvolum på 200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, men effekten var ikke stor ved små volum (10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) som ligner på reelle eksponeringsvolumer (0,017 \pm 0,04, 0,018 \pm 0,04 og 0,012 \pm 0,03 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{time}$) (94). Flere undersøkelser på små volum av propylenglykol og hudopptak av kjemikalier er derimot nødvendig for å bekrefte dette. En utfordring ved propylenglykol som løsemiddel er at det er viskøst (74), som kan føre til at det blir vanskelig for testkjemikaliet å absorberes gjennom huden og noe av testkjemikaliet vil forbli på hudens overflate (95).

For ^{14}C -metylparaben ble det brukt en fettbasert krem (30 % fett) som et løsemiddel. Fettbaserte kremmer danner ofte membraner som dekker og hydrerer huden og dermed fører til økt opptak av testkjemikalier (7). Denne studien støtter dette da opptaket av ^{14}C -metylparaben på intakt hud var høyere når ApoBase krem ble brukt som løsemiddel (kapittel 4.3.1) sammenlignet med propylenglykol (i forsøk for testing av reseptorløsninger, vedlegg 8.1): henholdsvis 72,0 % (n=10) og 31,6 % (n=5) hudopptak.

5.1.6 *Ex vivo* hud for opptak av kjemikalier

I denne studien ble det benyttet *ex vivo* forsøk til opptak av ^{14}C -metylparaben og ^{14}C -triklosan på intakt og skadet hud. Per i dag baserer risikovurderingsprosessen av kjemikalier seg på opptak av kjemikalier på intakt hud. Det er derimot lite kunnskap om opptak av kosmetiske ingredienser på skadet human hudbarriere (SC). Dette er grunnet etiske, praktiske og økonomiske årsaker som ikke tillater disse type forsøk på levende dyr/mennesker (5, 15, 84).

I EU ble det i 2013 forbudt å buke eksperimentelle dyreforsøk til å teste ingredienser som skal brukes i kosmetiske produkter (41). Av etiske grunner må man også være forsiktig med å teste ut kosmetiske ingredienser på mennesker da man kan påføre forsøkspersonene midlertidig

eller varige helseskader. Ved *in vivo* forsøk på mennesker kan det i tillegg være store variasjoner i forsøksresultatene mellom individene (5). *Ex vivo* forsøk tilbyr muligheten å teste nye kosmetiske ingredienser uten å må ta hensyn til etiske problemstillingene som er knyttet til mulige helseskader ved *in vivo* studier (84).

I følge Abd et. al, Kielhorn og Mangelsdorf og OECD er det en del studier som har indikert til overbevisende korrelasjoner mellom *in vivo* og *ex vivo* hudopptak forsøk (5, 15, 91). Generelt sett tyder disse studiene på at *ex vivo* systemer er gode til å predikere hudopptak av kjemikalier i *in vivo*, bortsett fra fire studier diskutert av Kielhorn og Mangelsdorf som viser et høyere hudopptak av kjemikalier i *in vivo* enn *ex vivo*. Grunnen til dårlige korrelasjoner i disse fire studiene kan være ustandardiserte eksperimentelle protokoller, siden disse forsøkene ble utført før etablering av standardiserte protokoller fra OECD (15).

I denne studien ble huden skjært av underliggende fettvevet, ved en tykkelse på 500 µm på alle hudprøvene før opptak av ¹⁴C-testkjemikaliene. Dette ble gjort for å begrense variabiliteten i opptaket mellom hudprøvene, siden dermis (et hydrofilt lag) fungerer også som en barriere for lipofile kjemikalier (som ¹⁴C-triklosan) i *in vitro* men ikke i *in vivo* forsøk (5, 79, 86). Dette skyldes at absorberende kjemikalier i *in vivo* behøver ikke å diffundere gjennom hele dermislaget for å kunne komme seg inn i blodårene og være tilgjengelig i systemiske sirkulasjonen i kroppen (79).

Hud benyttet i denne studien ble lagret opptil ett år ved -20 °C. Mange studier har indikert til at lagring av human hud ved -20 °C, opptil 12 måneder ikke påvirket hudbarrieren, ifølge Davis et. al (2004), Kielhorn og Mangelsdorf og Harrison et. al (15, 96, 97). Parca et. al og Ahlstrom et. al derimot indikerte at hudopptaket av hydrofile fluorscein og hydrokortison var høyere i tint hud (som har vært oppbevart ved -20 °C) sammenlignet med fersk hud, og jo lengere huden har vært frossen, jo høyere ble hudopptaket (85, 98). Grunnet til at disse studiene viser forskjellige resultater kan være at hud fra ulike arter med forskjellige lipidsammensetninger enn human hud ble brukt. Dette kan føre til at human hud tåler frysing bedre enn dyrehud. Parca et. al brukte hud fra gris fra ukjent antall donorer. Dersom de har brukt hud fra få donorer, vil ikke resultatene være representativ for grisehud. Andre grunner kan være forskjellige lagringsforhold som er knyttet til ulike laboratorier som gjør at effektene blir forskjellige. Det anbefales derfor å teste lagringseffektene på huden i hver individuell laboratorie.

5.1.7 Hudintegritet

Barrierefunksjonen er viktig med tanke på dermal absorpsjon. Hudintegriteten må derfor sjekkes før forsøksstart. I denne studien ble det brukt TEWL til å måle hudintegriteten. I følge EU-kommisjonens vitenskapskomite (SCCS/1358/10) er dette en av metodene som kan brukes, i tillegg til TEER (Transepidermal electrical resistance) og TWF (tritiated water flux) (12). Fordelene med TEWL er at den er det mest direkte mål på hudbarrierefunksjonen og gir reproducerbare målinger (73, 99). I tillegg gir den ingen effekt på huden og er lett å utføre (73, 100). Ulemper med TEWL er at målingene kan påvirkes faktorer som temperatur, luftfuktighet og fuktigheten til SC (73, 99). Derfor er det viktig å sørge for en konstant temperatur og luftfuktighet under TEWL-målinger (73, 100). I tillegg anbefales det å avklimatisere huden i minst 30 minutter før måling (84, 100). I dette prosjektet ble TEWL-verdier på noen hudprøver redusert etter tid (tabell 2). Dette kan skyldes at hudprøvene lå i romtemperatur kortere enn anbefalte tidsperioden (30 min, av Heylings et. al og Netzlaff et. al) før start av TEWL-målingene.

I denne studien ga TEWL en god indikasjon på prøver med store skader i hudbarriere ved at økningen i TEWL (4-8 ganger) ga tilsvarende økning i hudabsorpsjon. Dette stemmer med resultater fra Guth et. al som også har funnet at hudabsorpsjonsverdiene ble høyere når hudbarrieren ble klassifisert som dårlige ifølge TEWL (grenseverdi på $10 \text{ g/m}^2/\text{time}$) *in vitro* (101). Netzlaff et. al indikerte at TEWL ikke var sensitiv nok til å kunne oppdage små endringer som 3 teipskader da de sammenlignet TEWL verdier med opptak av flufenamin syre, men bare alvorlige skader i SC. Der fant de ingen statistisk signifikant forskjell i TEWL (n=6) mellom intakte og 3 gangers teipstrippet hudprøver, men derimot fant de statistisk signifikant forskjell i opptaket av flufenamin syre (100). Heylings et. al har også vist at TEWL ikke var sensitiv nok til å oppdage små skader i SC som én teipskade da de sammenlignet TEWL og TEER-verdiene etter teipstripping av huden. Samtidig viste Heylings et. al at TEER metoden er mer sensitiv og robust til å kunne oppdage en teip skade i SC og at den ikke blir påvirket av faktorene som TEWL påvirkes av (84). TEER bør derfor vurderes som et alternativ til TEWL ved videre studier for hudopptak av kjemikalier *in vitro*.

Grenseverdien for TEWL i denne studien er forskjellig fra grenseverdien som ble brukt i Guth et al, Heylings et al, og andre studier (84, 86, 101). Det er vanskelig å fastsette en generell grenseverdi for TEWL som skal gjelde for alle laboratorier da målingene er avhengig av mange faktorer som er forskjellig fra et laboratorium til et annet (84). Det er derfor viktig at hvert laboratorium definerer egne grenseverdier for TEWL.

5.1.8 Appliseringsmengde

Variasjoner i prosent testkjemikalie gjenvunnet (82-120 %) kan blant annet skyldes faktisk mengde testkjemikalie applisert. Ved forsøkene for opptak av ^{14}C -metylparaben, ble det brukt en spatel til å overføre testmateriale fra veieskipene til hudprøvene. Da det ikke er mulig å overføre alt testmaterialet vil det bli værende igjen noe testmateriale både i veieskipet og på spatelen. Det ble da et volum på mindre enn 4,5 mg ^{14}C -metylparaben i krem som ble tilgjengelig for absorpsjon på hudprøven. I tillegg var det ikke tilgjengelig finvekt som kunne benyttes til innveing av radioaktivt materiale, det ble derfor brukt en grovere vekt som vil ha unøyaktigheter med tanke på måling av små mengder testmateriale. Prosent testkjemikalie i de ulike kategoriene var forskjellige mellom hudprøvene i hver (skade)behandling og standardavviksverdiene var store. Dette viser at denne usikkerheten i innveinger av appliseringsvolum gjenspeiler seg på deteksjonsverdiene og dermed påvirker hudabsorpsjonsverdiene. For å få kontroll på mengdene som ligget igjen på spatelen og veieskipet, ble både spatelen og veieskipene tørket med en filterpapir (fuktet med 100 % etanol) en gang mellom hver applisering av testkjemikaliet i denne studien. Dette sørget for en bedre prosent testkjemikalie gjenvunnet. En mulig forbedring i denne prosedyren er å bruke en bomullspinne, hvor bomulldelen dekkes med parafilm. Denne delen brukes da til å spre ^{14}C -triklosan dråpen på hudprøven, deretter kuttet bomulldelen ved hjelp av en saks og settes direkte i telleglasset. På denne måten, vil alt gjenværende ^{14}C -testkjemikaliet kunne bli detektert ved scintillasjonstelleren.

Ifølge EU-kommisjonen skal gjenvinning av testkjemikaliet være på mellom 85-115 %. I det første forsøket med triklosan og forsøket med metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud oppfylte dette kravet, bortsett fra 2 hudprøver ved hvert forsøk som måtte ekskluderes fra videre beregninger for hudabsorpsjonsverdiene. I det andre forsøket med triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud derimot, lå alle verdiene for gjenvunnet testkjemikaliet på under 85 %. Forsøket ble derfor ikke godkjent. Den lave gjenvinningsprosenten kan skyldes at det ble brukt en spatel til å spre dråpen til ^{14}C -testkjemikaliet på hudprøven, og spatelen ble tørket med et fuktig filterpapir (100 % etanol) kun en gang mellom hver applisering av testkjemikaliet. Dette kan ha ført til at mye av ^{14}C -testkjemikaliet ble igjen på spatelen, og da ikke tatt med til telling med scintillasjonstelleren. Det som ble gjort bedre på første forsøket med ^{14}C -triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud er at hudprøvene ble fuktet med reseptorløsningen i 10 minutter før applisering av ^{14}C -merket testkjemikaliet. I tillegg ble det bevegdt litt med pipetten under pipetteringen. På denne måten ble ^{14}C -testkjemikaliet spredt på

fuktig hud bedre enn på tørr hud, uten at det måtte tas hensyn til testkjemikaliet som lå igjen på spatelen. Å pipettere volumet av ^{14}C -testkjemikaliet utover ulike steder i hudprøven, hjalp også med spredning av ^{14}C -testkjemikaliet.

For å få mindre variasjoner i prosent ^{14}C -triklosan gjenvunnet mellom hudprøvene, burde tuppen av pipettespissen klippes og telles etter hver applisering av ^{14}C -testkjemikaliet. Volumet som sitter igjen i pipettespissen vil da kunne bli detektert ved scintillasjonstelleren.

5.2 Opptak av ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud

I forsøkene hvor kun intakt hud ble brukt, ble de totale absorpsjonsverdiene forskjellige for testkjemikaliene i forhold til forsøk hvor både intakt og skadet hud ble testet. Dette kan skyldes forskjellen i antall hudprøver (10 versus 4) hvor flere hudprøver per behandling kan gi sikrere resultater. I tillegg vil det kunne være variasjoner i utførelsen av forsøkene (mange ledd i oppsettet) som igjen kan påvirke de endelige resultatene.

I denne studien ble opptaket av ^{14}C -triklosan ved første forsøket på intakt, teipstrippet og rispet hud henholdsvis $6 \pm 4,7 \%$, $2 \pm 1,6 \%$ og $8 \pm 3,2 \%$. I andre forsøket for ^{14}C -triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud ble opptaket henholdsvis $16 \pm 6,5 \%$, $27 \pm 8,2 \%$ og $28 \pm 5,1 \%$. Ved forsøket for ^{14}C -metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud, ble opptaket henholdsvis $78 \pm 4,7 \%$, $78 \pm 14,7 \%$ og $87 \pm 19,4 \%$.

Ved å sammenligne opptaket av ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben mellom intakt, teipstrippet og rispet hud, ble det ikke funnet statistisk signifikant forskjell (p -verdi $> 0,05$). Grunnen til dette kan være variasjoner i opptaket (dvs høyt standardavvik) mellom hudprøvene innen hver (skade)behandling. Et høyt standardavvik kan skyldes blant annet usikkerheter i appliseringsmengdene da løsningsmidlene var enten en viskøs væske eller en krem (diskutert i kapittel 5.1.8). Når det er variasjoner i hudopptaket mellom hudprøvene i hver (skade)behandling og mellom selve (skade)behandlingene, vil dette føre til dårlig diskriminering av opptaket mellom de ulike (skade)behandlingene.

Denne studien gir indikasjon på at hudopptaket av ^{14}C -triklosan kan øke når hudens barriere er skadet, og at dette fører til en redusert sikkerhetsmargin. I de to forsøkene med ^{14}C -triklosan på intakt og skadet hud, var det vesentlige forskjeller i verdiene for hudopptak etter teipstripping. Etter å ha ekskludert hudprøvene som hadde dårlige prosent gjenvinning i første forsøket for ^{14}C -triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud, ble gjennomsnitt total hudabsorpsjon for teipstrippet hudprøver lavere enn for intakt hud. I det andre forsøket

derimot, var verdiene høyere og på linje med de som ble funnet for rispet hud. Grunnen til denne forskjellen mellom forsøkene kan skyldes tekniske problemer som er vanskelig å identifisere. På grunn av usikkerhetene med tanke på opptaksverdiene for teipstrippet hud ble ikke resultatene fra det første forsøket brukt i videre beregninger av SED og MoS. Andre grunner for et høyere opptak på intakt hud enn skadet hud kan være at det ble store variasjoner i hudopptaket mellom hudprøvene ved samme (skade)behandling (særlig ved intakt hud) som gjør at gjennomsnittsverdiene ikke kan sammenlignes. Visse studier indikerer til at hudopptaket av kjemikalier øker når huden er teipstrippet: (Akomeah et. al (2007), Bronaugh og Stewart (1985), Schlupp et al. (2014)) (14, 76, 87).

Første forsøk for opptak av ^{14}C -triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud i denne studien viste en 1,5 gangs økning i prosent total hudabsorpsjon i rispet hud ($8,4 \pm 3,2 \%$) i forhold til intakt hud ($5,6 \pm 4,7 \%$). Selv om resultatene ikke er statistisk signifikante (p -verdi $> 0,05$), stemmer de overens med resultater fra Akomeah et. al og Schlupp et al. som også har funnet en økning i absorpsjon av veldig lipofile testkjemikalier (butylparaben og testosteron, $\log P > 3$) ved rispet hud i forhold til intakt hud (14, 87).

I det andre forsøket for hudopptak av ^{14}C -triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud, ble det en 1,7-1,8 gangs økning på skadet hudbarriere (teipstrippet og rispet hud) i forhold til intakt hud. Prosent ^{14}C -triklosan gjenvunnet for alle hudprøvene varierte fra 45 til 60 %. Disse verdiene ble ikke optimale i henhold til EU-kommisjonen (12, 41). Selv om gjenvinningen for de ulike hudprøvene var under 85 %, viste de liten variasjon både innenfor og mellom de ulike behandlingene. Selv om resultatene må omtales med forsiktighet kan de gi nyttig informasjon om forskjellene i absorpsjonsverdi mellom de ulike hud behandlingene.

Resultatene fra andre forsøket med ^{14}C -triklosan i denne studien stemte med Schlupp et. al som har benyttet veldig lipofile testosteron (med $\log P > 3$) i sin studie. Schlupp et al. viste også at opptaket øker når huden er teipstrippet og rispet ($14,8 \pm 2,1 \%$ på teipstrippet og $14,9 \pm 2,8 \%$ på rispet hud) i forhold til intakt hud ($7,8 \pm 2,6 \%$) (14).

Selv om skading av huden i denne studien ga ulike TEWL verdier mellom teipstripping og risping i det andre forsøket med triklosan ($11,2 \pm 2,59 \text{ g/m}^2$ for teipstrippet hud vs. $37,9 \pm 15,21 \text{ g/m}^2$ for rispet hud), ble totale hudabsorpsjonen tilnærmet lik mellom dem (henholdsvis $27 \pm 8,2 \%$ og $28 \pm 5,1 \%$). Grunnen til dette kan være at dybden på skaden av SC ikke påvirker hudopptaket av veldig lipofile kjemikalier da det hydrofile epidermis og dermis kan begrense diffusjonen av veldig lipofile kjemikalier uavhengig av tilstedeværelse av SC.

For ^{14}C -metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud, ble total hudabsorpsjon mellom intakt og teipstrippet hud tilnærmet like (henholdsvis $78 \pm 14,7\%$ vs. $78 \pm 4,7\%$). På rispet hud ($87 \pm 19,4\%$) ble det ca. 1,2 gangs økning i totale hudabsorpsjonen i forhold til intakt hud. Et høyere opptak av testkjemikalier i rispet hud enn teipstrippet hud i forhold til intakt hud stemmer overens med Akomeah et. al og Schlupp et. al som også har funnet at risting av huden ga høyere opptak av både svak lipofile (sorbin syre og metylparaben) og hydrofile kjemikalier (koffein og angiotensin 2) enn teipstripping av huden (14, 87). Bronaugh og Stewart derimot fant ut at teipstripping av huden ga høyere opptak av lipofile tritiert vann ($\text{Log } P_{\text{ow}} 1,38$) på teipstrippet hud enn rispet hud ($56,9 \pm 7,2\%$ på teipstrippet hud vs. $33,8 \pm 7,1\%$ på rispet hud) (76). Dette motstrider resultatene fra denne studien. Dette kan skyldes at Bronaugh og Stewart brukte en 19G kanyle, med en bredde på 0,01 cm. Det ble laget 4 rifter med skading av 6,4 % av totale arealet til huden. I denne studien derimot, ble det brukt en 21G kanyle (bredde: 0,08 cm). Totalt ble det laget 8 rifter, og arealet av huden som ble skadet ble beregnet til å være 42,7 %. Større nålbredde og høyere antall rifter kan være årsaken til at det ble oppnådd høyere hudopptak av ^{14}C -metylparaben på rispet hud enn teipstrippet hud. I tillegg har Bronaugh og Stewart brukt flere antall Scotch teip (12 stk) i forhold til antallet Scotch teip som ble brukt i denne studien (10 stk). Jo flere teip som brukes, jo flere SC lag fjernes.

^{14}C -metylparaben ble i mye høyere grad tatt opp i intakt hud enn ^{14}C -triklosan. Dette kan skyldes at siden ^{14}C -triklosan er meget lipofilt, begrenset hydrerte levende epidermis og dermis opptaket av ^{14}C -triklosan gjennom huden (7, 99). I følge Schlupp et. al og Kezic og Nielsen kan dette også være årsaken til lavere total hudabsorpsjon av veldig lipofile kjemikalier i forhold til mindre lipofile kjemikalier på intakt hud (14, 102). Triklosan har et større molekylvekt enn metylparaben, og siden store molekyler absorberes saktere gjennom huden enn små molekyler (7, 15), kan dette også være årsaken til at total hudabsorpsjon for ^{14}C -triklosan ble lavere enn for ^{14}C -metylparaben på intakt hud. En annen viktig årsak er at huden ble eksponert for ^{14}C -triklosan i 20 minutter, mens for ^{14}C -metylparaben derimot ved 24 timer. Det er kjent at opptaket av kjemikaliene øker ved økende eksponeringstid.

Sammenlignet med intakt hud, var det en økning i det totale opptaket av ^{14}C -triklosan på 1,5-1,8 ganger på skadet hud. Tilsvarende økning for ^{14}C -metylparaben var på 1,1 gang. Det vil si at det ble oppnådd høyere endring i opptaket av ^{14}C -triklosan enn ^{14}C -metylparaben på skadet hud i forhold til intakt hud. Dette motstrider med resultatene fra Akomeah et. al, Bronaugh og Stewart og Schlupp et. al som har funnet høyere skadeeffekt på opptak av mer hydrofile (som

metylparaben og koffein) enn mer lipofile kjemikalier som testosteron, benzosyre og butylparaben (14, 76, 87). Grunnen til at opptaket av hydrofile kjemikalier blir mer påvirket av hudskade enn lipofile kjemikalier kan være at siden SC er det eneste laget i huden som er lipofilt, vil kun dette laget begrense opptaket av mer hydrofile kjemikalier. Når SC skades eller fjernes vil mer hydrofile kjemikalier kunne diffundere lettere gjennom huden siden hydrofile epidermis og dermis ikke vil påvirke hudopptaket av dem i like stor grad som lipofile kjemikalier. For sterke lipofile kjemikalier derimot, er SC ikke det eneste hudlaget som virker som en barriere; Hydrofile epidermis og dermis vil også begrense hudopptaket av dem (14, 76, 87). I følge teorien burde effekten av hudskade derfor mest påvirke opptaket metylparaben enn triklosan. Grunnen til at det motsatte ble observert kan være flere: *i*) Store variasjoner i opptak av testkjemikaliene mellom hudprøvene innenfor (skade)behandlingene; *ii*) Store standardavvik kan gjøre at gjennomsnittsverdiene til hudopptak av testkjemikaliene til de ulike (skade)behandlingene er vanskelige å sammenligne; *iii*) Huden kan ikke ta opp mer enn 100 % av applisert mengde. Da triklosan i utgangspunktet tas opp i vesentlig mindre grad enn metylparaben i intakt hud ($6 \pm 4,7$ % versus $78 \pm 4,7$ %), vil skading av huden potensielt kunne gi en større relativ økning i opptaket av triklosan sammenlignet metylparaben.

5.3 Systemiske eksponeringsdoser (SED) og sikkerhetsmarginer (MoS) for opptak av triklosan og metylparaben på intakt og skadet hud

Forsøk 1 for ^{14}C -triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud oppfyller kravene til retningslinjene. Totalt hudopptak viser en tendens til å være høyere for rispet hud enn intakt hud, men etter å ha plussset på 2 SD, ble det ingen forskjell i totalt opptak av triklosan. Ergo vil det heller ikke forventes å være forskjeller i SED og MoS. Forsøk 2 oppfyller ikke kravene til retningslinjene, men viser samme trend som vi ser for metylparaben. Det bør derfor settes opp nye forsøk for triklosan for eventuelt å verifisere funnene i forsøk 2.

I SCCS (1414/11) risikovurdering av 0,3 % triklosan, ble SED etter eksponering på intakt hud beregnet til å være 0,0066, 0,0192 og 0,0030 mg/kg kroppsvekt/dag for henholdsvis håndsåpe, dusjsåpe og deodorant (51). Disse verdiene er forskjellige fra SED-verdiene som ble funnet for 0,3 % triklosan på intakt hud i denne studien (0,00150, 0,00126 og 0,00994 for henholdsvis håndsåpe, dusjsåpe og deodorant (roll-on)). Dette skyldes flere faktorer:

- Beregninger av SED utført av SCCS baserte seg på absorpsjonsverdiene som ble beregnet i $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dette førte til bruk av en annen ligning for beregning av SED sammenlignet med denne studien. Da ulike standardverdier brukes i disse to ligningene, kan det føre til

ulike SED-verdier. Ved absorpsjon oppgitt som $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ inkluderes informasjon om hudoverflateareal, frekvens for applikasjon av produkt og kroppsvekt i ligningen. Ved absorpsjon oppgitt som prosent inkluderes informasjon om estimert daglig eksponering for produktet per kilo kroppsvekt og konsentrasjonen av kjemikaliet i ligningen (ligning 1).

- Forskjeller i eksponeringstid før testkjemikaliet ble vasket av. I studiene SCCS baserer seg på var eksponeringstiden for triklosan 24 timer (47), i motsetning til denne studien hvor triklosan ble vasket av etter 20-minutters eksponeringstid. Eksponeringstid for testkjemikaliet påvirker hudabsorpsjonsverdiene, fordi lengere eksponeringstid kan føre til høyere opptak av kjemikalier (7, 15, 41).
- Ulike produktkategorier inngår i beregninger av aggregerte SED-verdi. SCCS beregnet en aggregert SED på 0,5256 mg/kg/kroppsvekt/dag på totalt 8 produkttyper, mens i denne studien ble aggregert SED estimert til å være 0,01269 mg/kg/kroppsvekt/dag basert på tre produkttyper. Inklusjon av antall produktkategorier i SCCS sin risikovurdering kan etter dagens forhold være for høyt da deres risikovurdering ble utført før nytt regelverk for triklosan trådte i kraft i EU i 2014 hvor bruken av triklosan i enkelte produkter ble forbudt (48).

Triklosan ble vasket av etter 20-minutters eksponeringstid, men siden deodoranter er et leave-on produkt burde det ha blitt satt opp et forsøk hvor testkjemikaliet ble vasket av etter minst 8 timers eksponering. Her kan det derfor være en underestimert bidraget fra deodoranter i total SED. I tillegg ble propylenglykol brukt som løsemiddel som er et substitutt for såpe men ikke en deodorant. Dette kan også påvirke SED, men det er ukjent i hvilken retning (dvs. om det er en over/underestimert). Disse punktene er en kilde til usikkerhet i beregningen. Da MoS er såpass høy som den er, vil usikkerhetene rundt hudopptak og SED-beregningene sannsynligvis ikke påvirke MoS i en slik grad at konklusjonen i denne studien endres.

Sammenlignet med Cowan-Ellsberry og Robinson som har beregnet SED-verdiene for metylparaben i en rekke kosmetiske produkter, i tillegg til aggregert SED-verdi (sum av 9 kroppspleieprodukter), var SED bare noe lavere (0,79 mg/kg kroppsvekt/dag) sammenlignet med denne studien (0,82 mg/kg kroppsvekt/dag) hvor 15 kosmetiske produkter ble brukt til beregning på intakt hud (103). Dette skyldes flere grunner:

- Konsentrasjonene av metylparaben i kroppsspleieproduktene som ble brukt til SED beregninger av Cowan-Ellsberry og Robinson var 0,2-0,35 %, mens i denne studien ble den maksimale tillatte konsentrasjon av metylparaben i kosmetikk brukt (0,4 %).
- Cowan-Ellsberry og Robinson beregnet SED til hver enkel kosmetisk produkt basert på hudabsorpsjonsverdien 100 %, mens i denne studien ble hudabsorpsjonsverdien til intakt hud (87,4 %) brukt. Når det gjelder aggregert SED-verdi derimot, benyttet Cowan-Ellsberry og Robinson en absorpsjonsverdi på 80 %. De brukte raffineringmetoder til denne beregningen (inkludert prosentandel av populasjonen som brukte de ulike kosmetiske produktene som inneholder metylparaben og prosentandel av produktene som metylparaben brukes i). Tilsvarende raffineringmetoder ble ikke utført ved beregning av SED-verdien for aggregerte eksponering for metylparaben på intakt hud i denne studien. I stedet ble standardverdien for aggregert daglig applisert mengde produkt, oppgitt i SCCS 'Notes of guidance' 10-ende versjon, benyttet (41).
- Cowan-Ellsberry og Robinsons beregningene av SED var basert på en standard for kroppsvekt på 60 kg, mens i denne studien ble E_{produkt} -verdiene fra SCCS 'Notes of guidance' 10-ende versjon (tabell 1) benyttet, hvor verdiene er basert på studiespesifikke kroppsvekter.
- Cowan-Ellsberry og Robinson fokuserte kun på kvinner i den amerikanske populasjonen, mens standardverdien oppgitt av SCCS er basert på begge kjønn i den europeiske populasjonen.

Den maksimale tillatte konsentrasjon av triklosan og metylparaben i kosmetiske produkter er benyttet til beregning av SED-verdiene. I tillegg antar man at samtlige produkter som inngår i en produktkategori inneholder triklosan eller metylparaben. Slike antagelser vil sannsynligvis føre til overestimering av SED-verdiene, da ikke alle produktene inneholder samme konserveringsmiddel og da mange kosmetiske produkter inneholder lavere konsentrasjoner av triklosan og metylparaben enn henholdsvis 0,3 % og 0,4 %. Dette vil da føre til lavere MoS enn om man hadde brukt de konsentrasjonsverdiene som er mer likt det som faktisk finnes på markedet. Ved beregning av aggregerte eksponeringsdosene for triklosan og metylparaben ble SED verdiene for alle kosmetiske produktene som inneholdt testkjemikaliene lagt sammen. Dette kan føre til overestimering av SED-verdiene til testkjemikaliene fordi det er lite sannsynlig at alle kosmetiske produktene brukes av samme individet hver dag, i en lang periode.

MoS for triklosan på intakt og skadet (rispet) hud ble funnet til å være henholdsvis 946 og 958. For metylparaben ble MoS beregnet til å være 1222 på intakt hud og 1068 for skadet (teipstrippet og rispet) hud. Det vil si at selv om MoS minket med økende grad av hudabsorpsjon, er alle MoS-verdiene over 100. Forskjellen i MoS-verdiene for triklosan på intakt og skadet hud er av liten praktisk betydning, men ved intakt hud var det store standardavvik (variasjoner) med tanke på opptaksverdiene som gir usammenlignbare gjennomsnittsverdier for de ulike (skade)behandlingene. Grunnen for usammenlignbare gjennomsnittsverdier ble diskutert i kapittel 5.2. MoS for triklosan er veldig høy (>900) slik at de usikkerhetene pga høyt standardavvik vil neppe føre til at MoS blir lavere enn 100. Derfor blir det konkludert med at bruk av 0,3 % triklosan i såpeprodukter og deodorant og 0,4 % metylparaben i en rekke ulike kosmetiske produkter kan anses for å være trygg når produktene påføres både intakt og skadet hud.

For andre kjemikalier hvor MoS er nærmere 100 basert på opptak ved intakt hud, vil derimot en økning av totalt hudopptak grunnet skadet hud kunne påvirke hudopptaket i en slik grad at beregnet MoS kan bli lavere enn 100. Da en stor andel av befolkningen har en svekket hudbarriere på grunn av blant annet eksem eller tørr hud, bør man vurdere om retningslinjene for testing av hudopptak og videre beregninger av SED og MoS også burde inkludere testing på skadet hud.

Beregningene for SED ble i denne studien estimert på basis av et europeiske lovverk og standardverdier, basert på den europeiske populasjonen. Resultatene fra denne studien gjelder dermed for den europeiske befolkningen. For andre steder i verden med f.eks. et annet bruksmønster for kosmetiske produkter og andre tillatte konsentrasjoner av det aktuelle kjemikalie, må SED og MoS beregnes på nytt.

5.4 Andre begrensninger ved forsøkene i denne studien

I følge retningslinjene skal det benyttes 8 hudprøver per behandling fra minst 4 donorer per oppsett (12). Grunnet praktiske årsaker er det vanskelig å inkludere flere enn 12 Franz-celler per oppsett. I forsøkene med både intakt og skadet hud ble det derfor benyttet kun 4 hudprøver per behandling, per testkjemikalie per oppsett. Dette gjorde at forsøkene til både ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben ikke ble optimale. Dersom to forsøk per testkjemikalie hadde blitt godkjent og/eller utført ville det ha vært optimalt. Planen var derfor å sette opp to forsøk per testkjemikalie slik at det totalt ble 8 hudprøver per behandling. Dataene ville deretter bli analysert ved hjelp av to-veis ANOVA.

For triklosan ble det kjørt to oppsett, men dessverre ble gjenvinningsgraden for lav i det andre oppsettet. For metylparaben, ble det for knapt med tid til å sette opp to forsøk da de innledende forsøkene/metodeutviklingen ble mer omfattende og tidkrevende enn planlagt. Våre konklusjoner er derfor kun basert på fire hudprøver per behandling og resultatene må tolkes med forsiktighet. Men ettersom risping av huden ga økt absorpsjon for både triklosan og metylparaben, gir dette gode holdepunkter for at skading i form av risping kan øke absorpsjon av kjemikalier.

Ved forsøkene for opptak av ^{14}C -triklosan ble det brukt propylenglykol som løsemiddel. Siden propylenglykol er en viskøs løsning, kan den være utfordrende å pipettere på grunn av at væsken trekker veldig sakte opp i pipetten. Dette kan ha medført til variasjoner i pipetterte volumer for ^{14}C -triklosan på hudprøvene. På denne måten vil det kunne være forskjeller/unøyaktigheter i hvor mye som pipetteres opp av testløsningen. Viskøse væsker kan også være vanskeligere å få ut av spissen igjen når testløsningen tilsettes hudbiten. Ergo risikerer man at mindre enn 17 μl avsettes på huden. Det å pipettere så små volum som 17 μl har en utfordring i at eventuell testløsning som kan ha blitt sittende igjen på utsiden av pipettespissen vil gi unøyaktigheter. For eksempel dersom det satt igjen en liten dråpe på utsiden, kunne denne ha blitt overført til hudbiten når testløsningen ble pipettert ut og mer enn 17 μl kunne ha blitt overført. Dette kan da ha ført til variasjoner i opptaket av ^{14}C -triklosan mellom hudprøvene ved samme (skade)behandling, fordi jo mer ^{14}C -testkjemikalie blir tilført til huden, jo høyere hudopptak av testkjemikaliet blir det til en viss grad før det blir oppnådd en metning (7, 15, 41).

Vekten som ble brukt i denne studien var ikke nøyaktig nok til innveininger av små mengder krem (675 og 4,5 mg). Dette førte til unøyaktigheter i innveide mengder krem, og dermed ble ikke mengde applisert metylparaben likt på alle hudprøvene.

6 Konklusjon

Hensikten med denne studien var å benytte Franz diffusjonscellesystemet til å undersøke om opptaket av triklosan og metylparaben øker når human hud har en skadet barriere i forhold til intakt hud. Deretter ble det undersøkt om et eventuelt økt opptak via hud med skadet barriere kan redusere sikkerhetsmarginen i slik grad at grenseverdier for bruk av disse stoffene i kroppspfleieprodukter bør endres.

Det ble valgt å skade *ex vivo* human hud med UVB-lys, teipstripping og risping. UVB-eksponering av både tint og fersk hud viste ingen statistisk signifikant økning (p-verdi > 0,05) i TEWL-verdiene mellom kontroll og UVB-eksponert hud (tint hud: kontroll: 3,5 g/m² vs. UVB-eksponert: 3,2 g/m², fersk hud: kontroll: 4,0 g/m² vs. UVB-eksponert: 5,1 g/m²). Dette kan indikere at hudintegriteten til *ex vivo* human hud ikke blir påvirket av UVB-behandling. Derfor ble det konkludert med å ekskludere UVB-skadebehandling fra videre undersøkelser på opptak av testkjemikaliene.

Det ble funnet ut at opptaket av både triklosan og metylparaben øker når huden er skadet (¹⁴C-triklosan: 8,4 ± 3,2 % på skadet hud vs. 5,6 ± 4,7 % på intakt hud, ¹⁴C-metylparaben: 87 ± 19,4 % på skadet hud vs. 78 ± 4,7 % på intakt hud), men økningen ikke er statistisk signifikant. Kanyleskadebehandling førte til høyere hudopptak av kjemikaliene enn teipskadebehandling. Selv om risping av huden førte til en ikke-signifikant økning av hudopptaket av testkjemikaliene, ble de estimerte MoS verdiene ved aggregert eksponering på skadet hud betydelig redusert i forhold til intakt hud for metylparaben (1068 ved skadet hud vs. 1222 ved intakt hud), men for triklosan derimot ble det ikke funnet noen betydelig endring i MoS på skadet hud (958 ved skadet hud vs. 946 ved intakt hud). Selv om MoS minket med økende grad av hudopptak, er alle MoS-verdiene over 100. Det betyr at bruk av 0,3 % triklosan i såpeprodukter og deodorant og 0,4 % metylparaben i en rekke ulike kosmetiske produkter kan anses for å være trygg når produktene påføres både intakt og skadet hud.

Av praktiske årsaker ble det i forhold til retningslinjene for hudopptak, brukt et for lite antall hudprøver (n=3-4) per (skade)behandling i hvertforsøk. Sikkerhetsmarginene for kjemikaliene ble estimert basert på absorpsjonsverdiene for dette antallet hudprøver per (skade)behandling. Videre undersøkelser trenges derfor til å estimere hudopptak og dermed sikkerhetsmarginer for kjemikaliene på større antall hudprøver per skadebehandling.

7 Referanser

1. Sugibayashi K. Skin Permeation and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical Compounds: Springer; 2017.
2. Papadopoulou E, Padilla-Sanchez JA, Collins CD, Cousins IT, Covaci A, de Wit CA, et al. Sampling strategy for estimating human exposure pathways to consumer chemicals. *Emerging Contaminants*. 2016;2(1):26-36.
3. Asante-Duah DK. Public health risk assessment for human exposure to chemicals: Springer; 2002.
4. Semple S. Dermal exposure to chemicals in the workplace: just how important is skin absorption? *Occupational and environmental medicine*. 2004;61(4):376-82.
5. Abd E, Yousef SA, Pastore MN, Telaprolu K, Mohammed YH, Namjoshi S, et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical pharmacology: advances and applications*. 2016;8:163.
6. Kolarsick PA, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011;3(4):203-13.
7. Moss GP, Gullick DR, Wilkinson SC. Predictive Methods in Percutaneous Absorption: Springer; 2015.
8. Tagami H. Stratum corneum cell layers. *Textbook of Aging Skin*. 2017:405-13.
9. Marino C. Skin physiology, irritants, dry skin and moisturizers: Washington State Department of Labor and Industries, Safety and Health ...; 2006.
10. Ruela ALM, Perissinato AG, Lino MEdS, Mudrik PS, Pereira GR. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;52(3):527-44.
11. Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin—relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Archives of dermatological research*. 1999;291(10):555-9.
12. SCCS. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients [Internet]. Belgium: European Commission; 2010 Jun 22. Report No.: SCCS/1358/10.
13. Farage MA, Miller KW, Maibach HI. Textbook of aging skin: Springer Science & Business Media; 2009.
14. Schlupp P, Weber M, Schmidts T, Geiger K, Runkel F. Development and validation of an alternative disturbed skin model by mechanical abrasion to study drug penetration. *Results in pharma sciences*. 2014;4:26-33.
15. Kielhorn J, Mangelsdorf I. Dermal absorption: World Health Organization; 2006.
16. E.Pray WSPaG. Causes and Treatment of Dry Skin U.S.A: U.S. Pharmacist; 23. April.2012 [10.Desember.2018]. Available from: <https://www.uspharmacist.com/article/causes-and-treatment-of-dry-skin>.
17. Rawlings AV, Watkinson A, Rogers J, Mayo A-M, Hope J, Scott IR. Abnormalities in stratum corneum structure, lipid composition, and desmosome degradation in soap-induced winter xerosis. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 1994;45(4):203-20.
18. Barco D, Giménez-Arnau A. Xerosis: a dysfunction of the epidermal barrier. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*. 2008;99(9):671-82.
19. Watanabe M, Tagami H, Horii I, Takahashi M, Kligman AM. Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis. *Archives of dermatology*. 1991;127(11):1689-92.
20. Levin J, Friedlander SF, Del Rosso JQ. Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 1: the role of filaggrin in the stratum corneum barrier and atopic skin. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 2013;6(10):16.

21. White M, Jenkinson DM, Lloyd D. The effect of washing on the thickness of the stratum corneum in normal and atopic individuals. *British Journal of Dermatology*. 1987;116(4):525-30.
22. Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, Girolomoni G, Puig L, Simpson E, et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. *Allergy*. 2018.
23. Paul C, Maumus-Robert S, Mazereeuw-Hautier J, Guyen C, Saudez X, Schmitt A. Prevalence and risk factors for xerosis in the elderly: a cross-sectional epidemiological study in primary care. *Dermatology*. 2011;223(3):260-5.
24. Augustin M, Kirsten N, Körber A, Wilsmann-Theis D, Itschert G, Staubach-Renz P, et al. Prevalence, predictors and comorbidity of dry skin in the general population. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2018.
25. Karagas MR, Stannard VA, Mott LA, Slattery MJ, Spencer SK, Weinstock MA. Use of tanning devices and risk of basal cell and squamous cell skin cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(3):224-6.
26. Bataille V, Boniol M, De Vries E, Severi G, Brandberg Y, Sasieni P, et al. A multicentre epidemiological study on sunbed use and cutaneous melanoma in Europe. *European journal of cancer*. 2005;41(14):2141-9.
27. Wehner MR, Chren M-M, Nameth D, Choudhry A, Gaskins M, Nead KT, et al. International prevalence of indoor tanning: a systematic review and meta-analysis. *JAMA dermatology*. 2014;150(4):390-400.
28. Lopes DM, McMahan SB. Ultraviolet radiation on the skin: a painful experience? *CNS neuroscience & therapeutics*. 2016;22(2):118-26.
29. Hruza LL, Pentland AP. Mechanisms of UV-induced inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*. 1993;100(1):35-41.
30. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc*. 2006;150(1):25.
31. Herndon JM, Hoisington RD, Whiteside M. Deadly ultraviolet UV-C and UV-B penetration to Earth's surface: Human and environmental health implications. *Journal of Geography, Environment and Earth Science International*. 2018:1-11.
32. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens—part D: radiation. *The lancet oncology*. 2009;10(8):751-2.
33. Biniek K, Levi K, Dauskardt RH. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012:201206851.
34. Lin Y-C, Lin C-F, Alalaiwe A, Wang P-W, Fang Y-P, Fang J-Y. UV filter entrapment in mesoporous silica hydrogel for skin protection against UVA with minimization of percutaneous absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;122:185-94.
35. Haque T, Crowther J, Lane M, Moore D. Chemical ultraviolet absorbers topically applied in a skin barrier mimetic formulation remain in the outer stratum corneum of porcine skin. *International journal of pharmaceutics*. 2016;510(1):250-4.
36. Permatasari F, Zhou B, Luo D. Epidermal barrier: Adverse and beneficial changes induced by ultraviolet B irradiation depending on the exposure dose and time. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013;6(2):287-92.
37. Jiang SJ, Chu AW, Lu ZF, Pan MH, Che DF, Zhou XJ. Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient. *Experimental dermatology*. 2007;16(12):985-92.
38. Giacomoni PU, Nadaud J, Straface E, Donelli G, Heenen M, Malorni W. Morphological alterations and cell blebbing in UV-irradiated human epidermis. *Archives of dermatological research*. 1998;290(3):163-6.
39. Shah V. P., Maibach H. I., Jenner J. *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence and penetration second edition ed.* USA: Springer; 2015.

40. International programme on chemical safety. Dermal exposure. Switzerland; 2014. Report No.: Environmental health criteria 242
41. SCCS. The SCCS Notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 10th revision. Tyskland; 2018. Report No.: SCCS/1602/18.
42. Halla N, Fernandes I, Heleno S, Costa P, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules*. 2018;23(7):1571.
43. Wang C-F, Tian Y. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental pollution*. 2015;206:195-201.
44. Brand W., Boom P.E., Hessel E.V.S., Meesters J.A.J., Weda M., Schurr A.G. Exposure to and toxicity of methyl-, ethyl- and propylparaben. Netherlands; 2017. Report No.: 2017-0028.
45. Moss T, Howes D, Williams FM. Percutaneous penetration and dermal metabolism of triclosan (2, 4, 4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether). *Food and chemical toxicology*. 2000;38(4):361-70.
46. Gardiner J, Freeman S, Leach M, Green A, Alcock J, D'Emanuele A. PAMAM dendrimers for the delivery of the antibacterial triclosan. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2008;23(5):623-8.
47. SCCP. Opinion on triclosan. Belgia; 2009. Report No.: SCCP/1192/08.
48. Weatherly LM, Gosse JA. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2017;20(8):447-69.
49. Barbolt TA. Chemistry and safety of triclosan, and its use as an antimicrobial coating on Coated VICRYL* Plus Antibacterial Suture (coated polyglactin 910 suture with triclosan). *Surgical infections*. 2002;3(S1):s45-s53.
50. Olaniyan L, Mkwetshana N, Okoh A. Triclosan in water, implications for human and environmental health. *Springerplus*. 2016;5(1):1639.
51. SCCS. Opinion on triclosan. Belgia; 2011. Report No.: SCCS/1414/11.
52. Dayan A. Risk assessment of triclosan [Irgasan®] in human breast milk. *Food and chemical toxicology*. 2007;45(1):125-9.
53. Adolfsson-Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*. 2002;46(9-10):1485-9.
54. Soni M, Taylor S, Greenberg N, Burdock G. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and chemical Toxicology*. 2002;40(10):1335-73.
55. Lin Y, Ferronato C, Deng N, Wu F, Chovelon J-M. Photocatalytic degradation of methylparaben by TiO₂: multivariable experimental design and mechanism. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2009;88(1-2):32-41.
56. Handa O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, et al. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology*. 2006;227(1-2):62-72.
57. SCCS. Opinion on Parabens. Belgia; 2010. Report No.: SCCS/1348/10.
58. Information NCfB. Methylparaben [Internet] [place unknown]: PubChem Database [cited 2019 Jan 23]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl_4-hydroxybenzoate#section=Vapor-Pressure.
59. Ma D, Chen L, Zhu X, Li F, Liu C, Liu R. Assessment of combined antiandrogenic effects of binary parabens mixtures in a yeast-based reporter assay. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014;21(10):6482-94.
60. Hu P, Chen X, Whitener RJ, Boder ET, Jones JO, Porollo A, et al. Effects of parabens on adipocyte differentiation. *Toxicological sciences*. 2012;131(1):56-70.

61. Barnes DG, Dourson M, Preuss P, Bellin J, Derosa C, Engler R, et al. Reference dose (RfD): description and use in health risk assessments. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 1988;8(4):471-86.
62. 01. Generelt om kjemikalier [Internet] Norway: Folkehelseinstituttet; 2014 Jun 11 [updated 2016 Jul 11; cited 2018 Sep 7]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/mihe/kjemikalier/01.-generelt-om-kjemikalier/>.
63. Pažoureková S, Hojerová J, Klimová Z, Lucová M. Dermal absorption and hydrolysis of methylparaben in different vehicles through intact and damaged skin: using a pig-ear model in vitro. *Food and chemical toxicology*. 2013;59:754-65.
64. Desmedt B, Ates G, Courselle P, De Beer JO, Rogiers V, Hendrickx B, et al. In vitro Dermal Absorption of Hydroquinone: Protocol Validation and Applicability on Illegal Skin-Whitening Cosmetics. *Skin Pharmacol Physiol*. 2016;29(6):300-8.
65. Calafat AM, Valentin-Blasini L, Ye X. Trends in exposure to chemicals in personal care and consumer products. *Current environmental health reports*. 2015;2(4):348-55.
66. Lu S, Yu Y, Ren L, Zhang X, Liu G, Yu Y. Estimation of intake and uptake of bisphenols and triclosan from personal care products by dermal contact. *Sci Total Environ*. 2018;621:1389-96.
67. Proksch E, Fölster-Holst R, Jensen J-M. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *Journal of dermatological science*. 2006;43(3):159-69.
68. Seyfarth F, Schliemann S, Antonov D, Elsner P. Dry skin, barrier function, and irritant contact dermatitis in the elderly. *Clinics in dermatology*. 2011;29(1):31-6.
69. Nielsen JB. Percutaneous penetration through slightly damaged skin. *Archives of dermatological research*. 2005;296(12):560-7.
70. Halling-Overgaard AS, Kezic S, Jakasa I, Engebretsen K, Maibach H, Thyssen J. Skin absorption through atopic dermatitis skin: a systematic review. *British Journal of Dermatology*. 2017;177(1):84-106.
71. Nielsen JB, Nielsen F, Sørensen JA. Defense against dermal exposures is only skin deep: significantly increased penetration through slightly damaged skin. *Archives of dermatological research*. 2007;299(9):423-31.
72. Guideline OT. 428. Skin absorption: in vitro method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section. 2004;4.
73. Antonov D, Schliemann S, Elsner P. Methods for the assessment of barrier function. *Skin Barrier Function*. 49: Karger Publishers; 2016. p. 61-70.
74. Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler D, et al. Safety assessment of propylene glycol, tripropylene glycol, and PPGs as used in cosmetics. *International journal of toxicology*. 2012;31(5_suppl):245S-60S.
75. Norman RA. Xerosis and pruritus in the elderly: recognition and management. *Dermatologic Therapy*. 2003;16(3):254-9.
76. Bronaugh RL, Stewart RF. Methods for in vitro percutaneous absorption studies V: permeation through damaged skin. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1985;74(10):1062-6.
77. Frederiksen M, Vorkamp K, Jensen NM, Sørensen JA, Knudsen LE, Sørensen LS, et al. Dermal uptake and percutaneous penetration of ten flame retardants in a human skin ex vivo model. *Chemosphere*. 2016;162:308-14.
78. Pelling D, Phillips J, Cunnigham M. Absorption of hydrophilic and lipophilic compounds through epidermal and subepidermal strata of rat skin in vitro. *Toxicology in vitro*. 1997;12(1):47-55.
79. Scott RC, Ramsey JD. Comparison of the in vivo and in vitro percutaneous absorption of a lipophilic molecule (cypermethrin, a pyrethroid insecticide). *Journal of investigative dermatology*. 1987;89(2):142-6.

80. Thors L, Koch B, Koch M, Hägglund L, Bucht A. In vitro human skin penetration model for organophosphorus compounds with different physicochemical properties. *Toxicology in Vitro*. 2016;32:198-204.
81. Herud MMM. Dermal absorption of triclosan following short-, and long-term exposure in an ex vivo human skin model-implications for safe use in personal care products: Norwegian University of Life Sciences, Ås; 2017.
82. Moody R, Martineau P. An automated in vitro dermal absorption procedure: I. Permeation of ¹⁴C-labelled N, N-diethyl-m-toluamide through human skin and effects of short-wave ultraviolet radiation on permeation. *Toxicology in vitro*. 1990;4(3):193-9.
83. Solomon AE, Lowe N. Percutaneous absorption in experimental epidermal disease. *The British journal of dermatology*. 1979;100(6):717-22.
84. Davies DJ, Heylings JR, McCarthy TJ, Correa CM. Development of an in vitro model for studying the penetration of chemicals through compromised skin. *Toxicology in Vitro*. 2015;29(1):176-81.
85. Praça FSG, Medina WSG, Eloy JO, Petrilli R, Campos PM, Ascenso A, et al. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;111:121-32.
86. Gerstel D, Jacques-Jamin C, Schepky A, Cubberley R, Eilstein J, Grégoire S, et al. Comparison of protocols for measuring cosmetic ingredient distribution in human and pig skin. *Toxicology in Vitro*. 2016;34:153-60.
87. Akomeah FK, Martin GP, Muddle AG, Brown MB. Effect of abrasion induced by a rotating brush on the skin permeation of solutes with varying physicochemical properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;68(3):724-34.
88. Clowes H, Scott R, Heylings J. Skin absorption: flow-through or static diffusion cells. *Toxicology in vitro*. 1994;8(4):827-30.
89. Bronaugh RL, Stewart RF. Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1985;74(1):64-7.
90. Van de Sandt J, Van Burgsteden J, Cage S, Carmichael P, Dick I, Kenyon S, et al. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2004;39(3):271-81.
91. OECD. Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies 2004.
92. Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Effect of propylene glycol on ibuprofen absorption into human skin in vivo. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2008;97(1):185-97.
93. Fang JL, Vanlandingham M, da Costa GG, Beland FA. Absorption and metabolism of triclosan after application to the skin of B 6 C 3 F 1 mice. *Environmental toxicology*. 2016;31(5):609-23.
94. Hilton J, Woollen BH, Scott RC, Auton TR, Trebilcock KL, Wilks MF. Vehicle effects on in vitro percutaneous absorption through rat and human skin. *Pharmaceutical research*. 1994;11(10):1396-400.
95. Kielhorn J, Mangelsdorf I. Dermal absorption: World Health Organization; 2006.
96. Davies DJ, Ward R, Heylings J. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicology in vitro*. 2004;18(3):351-8.
97. Harrison S, Barry B, Dugard P. Effects of freezing on human skin permeability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1984;36(4):261-2.
98. Ahlstrom LA, Cross S, Mills P. The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2007;30(5):456-63.
99. Levin J, Maibach H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *Journal of controlled release*. 2005;103(2):291-9.

100. Netzlaff F, Kostka K-H, Lehr C-M, Schaefer UF. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;63(1):44-50.
101. Guth K, Schäfer-Korting M, Fabian E, Landsiedel R, Van Ravenzwaay B. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2015;29(1):113-23.
102. Kezic S, Nielsen JB. Absorption of chemicals through compromised skin. *International archives of occupational and environmental health*. 2009;82(6):677-88.
103. Cowan-Ellsberry CE, Robison SH. Refining aggregate exposure: example using parabens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2009;55(3):321-9.

8 Vedlegg

8.1 Testing av reseptorløsninger (metode og resultat)

Det ble valgt ulike reseptorløsninger for å finne en optimal reseptorløsning til ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben. Reseptorløsningene som ble prøvd ut var: NaCl, destillert H_2O , 30 % etanol, 50 % etanol og 70 % etanol. Det ble da benyttet 10 hudprøver fra samme donoren (kvinne, 68 år); 5 hudprøver til ^{14}C -metylparaben og 5 hudprøver til ^{14}C -triklosan.

Hudprøvene monterte på Franz diffusjonscellene (Figur 4). Hver av de 5 reseptorløsningene ble prøvd ut på 2 hudbiter med både ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben. Reseptorløsningene ble tilsatt reseptorkammeret i Franzcellene slik at det ikke var luft mellom væsken og undersiden av hudbitene. Ti minutter før testkjemikaliene ble tilsatt, ble Hudprøvenes overflatene fuktet med 10 μL NaCl. Deretter ble 17 μl av 0,3 % ^{14}C -triklosan tilsatt 5 hudbiter med hver sin reseptorløsning, og de resterende 5 hudbitene (Franz celler) med forskjellige reseptorløsninger ble tilsatt 17 μl 0,4 % ^{14}C -metylparaben. I dette pilotforsøket ble begge testkjemikaliene løst i propylenglykol. Fra uttaksporten til reseptorkamrene ble det tatt ut 100 μL reseptorløsning etter 1, 2, 4, 20 og 24 timers inkubering. Etter hvert uttak av en reseptorløsning ble det tilsatt nye 100 μL reseptorløsning til diffusjonscellen slik at væskemengden holdt seg konstant og hudbitene var fortsatt i kontakt med reseptorløsningen. Mengde radioaktivitet i hver prøve ble målt ved hjelp av en scintillasjonsteller. For ^{14}C -triklosan ble 30 % etanol den beste egnet reseptorløsning, og for ^{14}C -metylparaben ble 0,9 % natriumklorid (NaCl) den beste egnet reseptorløsning. Se kapittel 5.1.1.

TEWL-verdiene for hudprøvene og gjennomsnittsverdiene ble lagt i tabell 14.

Tabell 14. Transepidermal vanntap verdiene for hudprøvene til testing av reseptorløsninger.

Hud	Måling a (g/m^2)	Måling b (g/m^2)	Måling c (g/m^2)	Gjennomsnitt måling
1	6	6	7	6,33
2	7,1	7	6,5	6,87
3	5,6	5,2	6,3	5,70
4	5,6	5,4	5,9	5,63
5	6	5,2	5,8	5,67
6	5,5	5,3	5,8	5,53
7	4,7	4,6	5,1	4,80
8	4,5	4,5	4,3	4,43
9	5,3	6,1	6,2	5,87
10	4,9	4,9	5	4,93

Det ble tatt ut 100 µl fra hver reseptorløsning etter: 1,2,4,20 og 24 timers inkubering og etterfylt med nye 100 µl reseptorløsninger slik at væsknivået var konstant. Alle prøvene ble telt i scintillasjonsteller. Deretter ble det tatt ut 1 ml av hver reseptorløsning fra uttaksporten etter inkubering med test-kjemikaliene ved 24 timer og målt i scintillasjonsteller. Dette ble gjort for å beregne absorpsjonsverdiene av ¹⁴C-merket test-kjemikaliene i prosent i hele volumet til reseptorløsningene. Prosent absorpsjonsverdiene for uttakene for ulike reseptorløsningene etter ulike inkuberingsperioder ble lagt i tabell 15 (for ¹⁴C-triklosan) og 16 (for ¹⁴C-metylparaben).

Tabell 15. Prosent absorpsjonsverdier av ¹⁴C-triklosan i ulike reseptorløsninger ved ulike tidsperioder

Tid	NaCl	Dest vann	30 % etanol	50 % etanol	70 % etanol
1 time (100 µl)	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03
2 timer (100 µl)	0,02	0,01	0,02	0,00	0,03
4 timer (100 µl)	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01
20 timer (100 µl)	0,01	0,05	0,07	0,12	0,22
24 timer (100 µl)	0,03	0,10	0,09	0,15	0,26
24 timer (total volum)	0,45	8,52	8,55	18,39	27,65

*Dest vann= Destillert vann

*NaCl= Natriumklorid

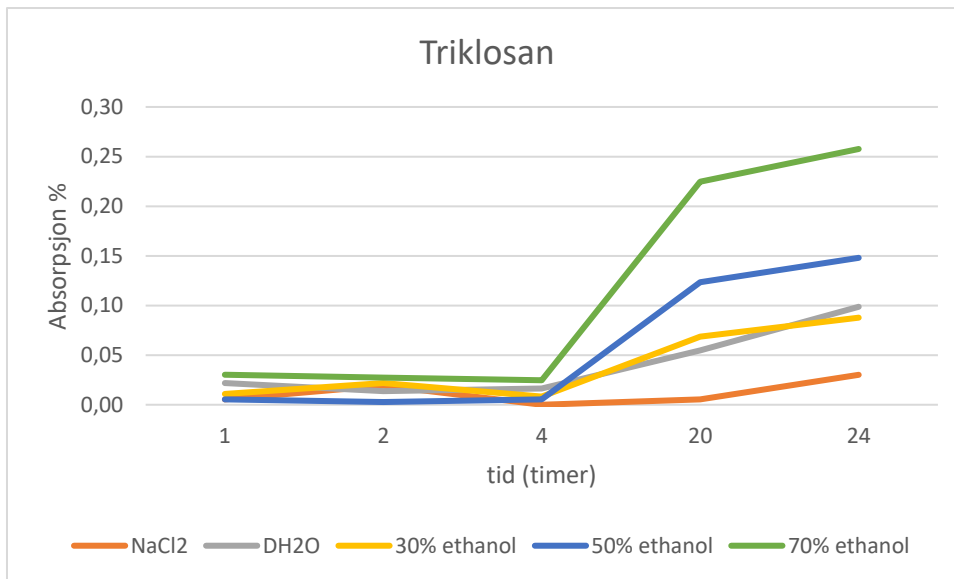
Tabell 16. Prosent absorpsjonsverdier av ¹⁴C-metylparaben i ulike reseptorløsninger ved ulike tidsperioder

Tid	NaCl	Dest vann	30 % etanol	50 % etanol	70 % etanol
1 time (100 µl)	0,02	0,09	0,04	0,00	0,02
2 timer (100 µl)	0,00	0,01	0,02	0,04	0,00
4 timer (100 µl)	0,01	0,01	0,03	0,04	0,01
20 timer (100 µl)	0,33	0,22	0,10	0,26	0,07
24 timer (100 µl)	0,32	0,32	0,06	0,25	0,11
24 timer (total volum)	31,59	27,19	6,83	22,69	11,22

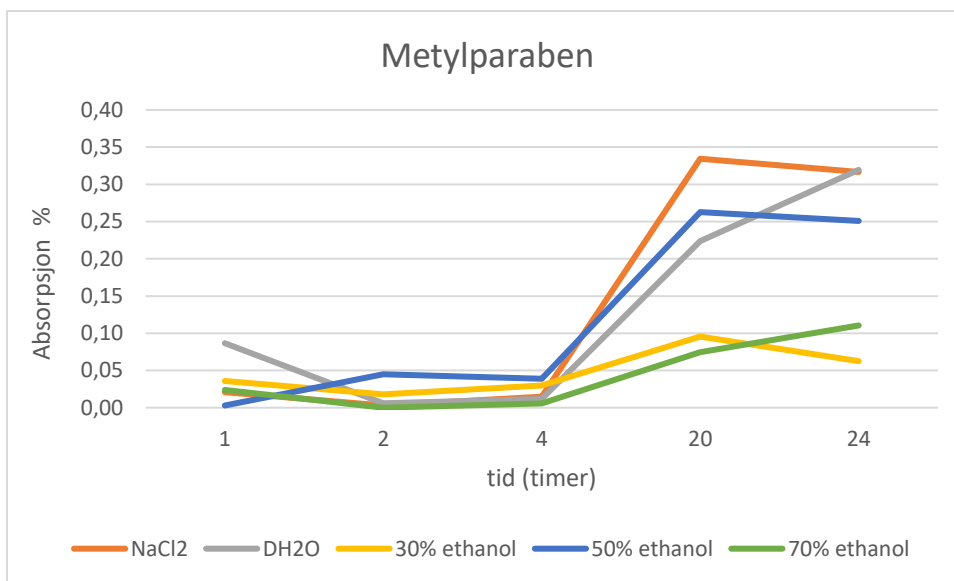
*Dest vann= Destillert vann

*NaCl= Natriumklorid

Deretter ble det laget diagrammer (Figur 8 og 9) for både ¹⁴C-metylparaben og ¹⁴C-triklosan som viser i hvilke reseptorløsninger er test-kjemikaliene høyest løselig i.



Figur 8. Plott av absorpsjon av ¹⁴C-triklosan (i prosent) mot inkuberingstid (i timer) i hver av de ulike reseptorløsningene (diagrammene); Natriumklorid (NaCl, oransje), destillert vann (DH₂O, grå), 30 % etanol (gul), 50 % etanol (blå) og 70 % etanol (grønn).



Figur 9. Plott av absorpsjon av ¹⁴C-metylparaben (i prosent) mot inkuberingstid (i timer) i hver av de ulike reseptorløsningene (diagrammene); Natriumklorid (NaCl, oransje), destillert vann (DH₂O, grå), 30 % etanol (gul), 50 % etanol (blå) og 70 % etanol (grønn).

Fra figurene 7 og 8 vises det at for test-kjemikalien ¹⁴C-triklosan er absorpsjonsverdiene høyest i reseptorløsningen 70 % etanol i vann, mens for ¹⁴C-metylparaben er absorpsjonsverdiene høyest ofte i reseptorløsningen natriumklorid (NaCl). Siden høye konsentrasjoner av etanol kan interferere med permeabilitetsfunksjonen til huden, ble det bestemt at 30 % etanol i vann er reseptorløsningen som er egnet til forsøkene på hudopptak av

^{14}C -triklosan. Det ble bestemt at 0,9 % natriumklorid er reseptorløsningen som er egnet til forsøkene på hudopptak av ^{14}C -metylparaben (se kapittel 5.1.1).

8.2 Testing av blandbarhet til ^{14}C -metylparaben i fuktighetskrem

For å finne ut hvordan man får en homogen blanding av ^{14}C -metylparaben i Apobase kremen som ble brukt som løsemiddel, ble et farget kjemikalie (0,4 % trypanblått) brukt for å få visualisert hvor mye manuel røring som skulle til for å få en homogen blanding. Det ble brukt en tynn trepinne til å røre med. Røringen ble gjort i 8-tall, og etter 150 omrøringer ble det en jevn blåfarge på kremen.

8.3 Optimalisering av prosedyren for separering av hudlagene

Prosent ^{14}C -testkjemikalie gjenvunnet ble ikke godkjent (lavere enn 85-110 %), derfor måtte prosedyren optimaliseres for å få bedre gjenvinning av ^{14}C -testkjemikalie. Separering av hudlagene ved optimalisering ble utført på samme måte som nevnt over i dette kapitlet, bortsett fra at hudprøvene ble plassert på aluminiumsfolie på skjærebrettet før utstansing av hudsirkelene. Undersidene av hudprøvene og tilhørende aluminiumsfoliene som lå under, etter utstansing, ble tørket med tørt filterpapir. Filterpapirene ble lagt i egne telleglass.

8.4 Optimalisering av prosedyren for vask av utstyr

Vask av utstyr ble gjort på samme måte som nevnt ovenfor i dette kapitlet. Det er blitt gjort endringer for å øke deteksjon av absorpsjonsverdiene for test-kjemikaliene. Endringene er følgende:

- Aluminiumsfoliene som lå under hver prøve, ble lagt i eget telleglass.
- Parafilmene som ble brukt til å dekke diffusjonscellene ble telt i scintillasjonstalleren (etter at de ble tørket av med bomullspinner).
- Donor-kammeret i Franz cellene ble vasket med fuktige filterpapir (fuktet med ren etanol) og tørket med tørt filterpapir. Filterpapirene ble telt i scintillasjonstalleren.
- Reseptor-kammeret ble vasket med 1 ml ren etanol (i stedet for 1 ml reseptorløsning). Begerglass og petriskål som tilhørte prøvene ble også vasket med 1 ml ren etanol.

8.5 Hud og TEWL

8.5.1 Opptak av ^{14}C -triklosan og ^{14}C -metylparaben på intakt hud

Gjennomsnitt og standardavvik av alle TEWL-verdiene ble beregnet for alle hudprøver (Tabell 17 og 18).

Tabell 17. TEWL-målinger for hver hudprøve (3 målinger), gjennomsnitts TEWL-verdiene og standardavvikene for hudprøvene benyttet for opptak av ¹⁴C-triklosan på intakt hud

Hudprøve	TEWL måling 1 (g/m ²)	TEWL måling 2 (g/m ²)	TEWL måling 3 (g/m ²)	Gjennomsnitt (g/m ²)	Standardavvik
#33-A	3,20	4,30	3,80	3,77	0,55
#34-B	4,50	4,50	4,60	4,53	0,06
#33-C	3,50	3,80	3,50	3,60	0,17
#34-D	5,10	4,40	3,90	4,47	0,60
#34-E	4,20	3,90	3,80	3,97	0,21
#38-F	4,90	4,50	4,50	4,63	0,23
#38-G	4,90	5,20	4,70	4,93	0,25
#38-H	5,40	5,60	5,20	5,40	0,20
#50-J	5,30	5,30	6,10	5,57	0,46
#50-K	4,80	5,00	5,00	4,93	0,12

Tabell 18. TEWL-verdier for hver hudprøve (3 målinger), gjennomsnitts TEWL-verdi og standardavviket for hudprøvene benyttet for opptak av ¹⁴C-metylparaben på intakt hud.

Hudprøve	TEWL måling 1 (g/m ²)	TEWL måling 2 (g/m ²)	TEWL måling 3 (g/m ²)	Gjennomsnitt (g/m ²)	Standardavvik
#35-A	5,80	5,10	5,10	5,33	0,40
#28-B	4,10	3,50	3,90	3,83	0,31
#29-C	4,40	4,90	4,60	4,63	0,25
#28-D	4,10	4,20	3,90	4,07	0,15
#35-E	5,90	5,50	5,30	5,57	0,31
#29-F	4,40	5,20	5,60	5,07	0,61
#40-G	5,50	5,60	4,50	5,20	0,61
#28-H	4,50	5,00	5,00	4,83	0,29
#40-I	5,80	5,60	6,10	5,83	0,25
#35-J	4,80	4,90	4,60	4,77	0,15

8.5.2 Forsøk 1 for hudopptak av ¹⁴C-triklosan på intakt, teipstrippet og rispet hud

Det ble brukt totalt 12 hudprøver i første forsøket for hudopptak av ¹⁴C-triklosan på intakt, teipskadet og kanyleskadet hud. Alle huddonorene var kvinner, 29-46 år. TEWL ble målt på samme måte som gjort ovenfor, før skading av hudprøvene, og verdiene ble lagt i tabell 19.

Tabell 19. Transepidermal vanntap målingene for hudprøvene som ble benyttet for opptak av ¹⁴C-triklosan, før behandlinger med ulike typer hudskader (3 målinger per hudprøve), gjennomsnitt og standardavvik verdiene (forsøk 1).

Hudprøve	Måling 1 (g/m ²)	Måling 2 (g/m ²)	Måling 3 (g/m ²)	Gjennomsnitt (g/m ²)	Std. avvik
A	3,60	2,30	2,60	2,83	0,68
B	3,60	3,70	4,00	3,77	0,21
C	4,30	3,30	3,40	3,67	0,55
D	2,20	3,10	2,60	2,63	0,45
E	2,60	3,20	2,60	2,80	0,35
F	3,30	3,40	3,30	3,33	0,06
G	2,70	3,60	3,50	3,27	0,49
H	3,00	----	- ---	3,00	----
I	2,60	3,00	2,60	2,73	0,23
J	2,90	----	- ---	2,90	----
K	3,50	3,60	- ---	3,55	0,07

På grunn av tekniske problemer med TEWL-instrumentet, ble det ikke målt TEWL 3 ganger på hudprøvene H, J og K som ble benyttet i dette forsøket (tabell 5). TEWL ble målt etter hver behandling (teipstripping og risping) og TEWL-verdiene ble lagt i tabell 20.

Tabell 20. Transepidermal vanntap målinger for hudprøvene som ble benyttet for opptak av ¹⁴C-triklosan, etter behandlinger med ulike typer skader (3 målinger per hudprøve), gjennomsnitt og standardavvikverdiene (forsøk 1).

Hudprøve	Behandling	Måling 1 (g/m ²)	Måling 2 (g/m ²)	Måling 3 (g/m ²)	Gjennomsnitt (g/m ²)	Standardavvik
A	Kontroll (intakt)					
B	Kontroll (intakt)					
C	Teipstrippet	4,60	2,80	4,40	3,93	0,99
D	Teipstrippet	3,70	2,60	3,90	3,40	0,70
E	Rispet	43,20	41,90	36,00	40,37	3,84
F	Rispet	40,10	43,00	39,70	40,93	1,80
G	Rispet	33,00	38,40	40,20	37,20	3,75
H	Rispet	49,90	48,20	49,70	49,27	0,93
I	Teipstrippet					
J	Teipstrippet	3,30	3,20	3,50	3,33	0,15
K	Kontroll (intakt)					

L	Kontroll (intakt)					
---	-------------------	--	--	--	--	--

Tabell 20 viser at det ikke ble stor økning i TEWL verdiene ved teipstripping med 3 Corneotape biter. Kontrollhudprøvene ble kun målt for TEWL 3 ganger. På grunn av tekniske problemer med TEWL-instrumentet ble det ikke målt TEWL på hudprøve I, som ble benyttet i dette eksperimentet (tabell 7). Tabell 7 viser også at TEWL verdiene økte ikke mer enn 1 gang etter skading av hudprøvene med 3 Corneotape biter, mens med 8 rifter ved hjelp av en kanyle førte det til 11-16 gangers økning i TEWL.

8.5.3 Forsøk 2 for hudopptak av ¹⁴C-triklosan på intakt, teipskadet og rispet hud
 Det ble brukt totalt 12 hudprøver i andre forsøket for hudopptak av ¹⁴C-triklosan på intakt, teipskadet og kanyleskadet hud. Alle huddonorene var kvinner, 29-46 år. TEWL ble målt på samme måte som nevnt i kapittel 8.5.1 før skading av hudprøvene, og verdiene ble lagt i tabell 21

Tabell 21. TEWL verdier, gjennomsnitt TEWL og standardavvik for hudprøver til forsøk 2 for hudopptak av ¹⁴ C-triklosan før skading av hudprøvene					
Hudprøve	TEWL 1 (g/m ²)	TEWL 2 (g/m ²)	TEWL 3 (g/m ²)	Gjennomsnitt (g/m ²)	Standardavvik
# 23-A	5,5	6,1	5,8	5,8	0,3
# 23-E	4,5	4,2	4,2	4,3	0,2
# 23-C	5,9	5,9	5,3	5,7	0,3
# 37-B	4,3	4,6	4,9	4,6	0,3
#37-D	3,5	4,1	3,9	3,8	0,3
# 37-F	5,6	5,4	5,7	5,6	0,2
# 40-K	4,0	4,3	3,7	4,0	0,3
# 40-I	5,6	5,2	4,7	5,2	0,5
# 40-G	5,4	6,2	5,9	5,8	0,4
# 43-L	4,7	4,7	4,7	4,7	0,0
# 43-J	4,7	5,7	4,3	4,9	0,7
# 43-H	4,3	4,3	4,3	4,3	0,0

*TEWL= Transepidermisk vanntap

TEWL ble målt etter hver behandling (teipstripping og risping) og TEWL-verdiene ble lagt i tabell 22. TEWL ble ikke målt igjen på hudprøvene som ikke ble skadet (A, B, K og L).

Tabell 22. TEWL verdier, gjennomsnitt TEWL og standardavvik etter ulike typer skadingsmetoder av hudprøvene til hudopptak av ¹⁴ C-trikolsan						
Hudprøve	Behandling	TEWL 1 (g/m ²)	TEWL 2 (g/m ²)	TEWL 3 (g/m ²)	Gjennomsnitt (g/m ²)	Standardavvik
# 23-A	Intakt					
# 23-E	Teipskadet	12,6	12,2	10	11,6	1,4
# 23-C	Rispet	45,8	48,1	45,7	46,5	1,4
# 37-B	Intakt					
#37-D	Teipskadet	11,6	12,4	10,9	11,6	0,8
# 37-F	Rispet	42,3	43,2	47,6	44,4	2,8
# 40-K	Intakt					
# 40-I	Teipskadet	8,6	7,6	7	7,7	0,8
# 40-G	Rispet	45,9	44,7	45,7	45,4	0,6
# 43-L	Intakt					
# 43-J	Teipskadet	15,3	13,9	12,8	14,0	1,3
# 43-H	Rispet	16,4	15,4	13,4	15,1	1,5

Fra tabell 21 og 22 vises det at TEWL verdiene økte 1-3 ganger etter teipstripping med 3M Scotch teip. TEWL verdiene økte 4-8 ganger etter skading av hudprøver med kanyle.

8.5.4 Opptak av ¹⁴C-metylparaben på intakt, teipstrippet og rispet hud

Det ble brukt totalt 12 hudprøver i forsøket for hudopptak av ¹⁴C-metylparaben på intakt, teipskadet og kanyleskadet hud. Alle huddonorene var kvinner, 37-68 år. TEWL ble målt på samme måte som nevnt i kapittel 8.5.1 før skading av hudprøvene, og verdiene for TEWL før skading av hud, gjennomsnitt TEWL verdiene og standardavvikene ble lagt i tabell 23

Tabell 23. Transepidermal vanntap (TEWL) målingene for hudprøvene som ble benyttet for opptak av ¹⁴ C-metylparaben, før behandlinger med ulike typer hudskader (3 målinger per hudprøve), gjennomsnitt og standardavvikene.					
Hudprøve	TEWL 1 (g/m ²)	TEWL 2 (g/m ²)	TEWL 3 (g/m ²)	Gjennomsnitt (g/m ²)	Standardavvik
# A-40	3,5	4,3	4,4	4,1	0,49
# C-40	3,9	3,7	3,9	3,8	0,12
# E-40	4,2	4,3	4,2	4,2	0,06
# B-52	5,5	5,6	5,8	5,6	0,15
# D-52	4,3	4,4	4	4,2	0,21
# F-52	4,8	4,5	4,6	4,6	0,15
# K-51	4,8	4,2	4,9	4,6	0,38
# I-51	3,9	4,3	4	4,1	0,21
# G-51	5,4	5	5,4	5,3	0,23
# L-37	4,8	5,4	5,3	5,2	0,32
# J-37	5,7	5,7	5,9	5,8	0,12
# H-37	5,3	5,1	5,4	5,3	0,15

Etter skading av noen hudprøver ved kanyle og teipstripping, ble TEWL målt igjen på hudprøvene som ble skadet (3 ganger hver). TEWL målingene ble gjentatt kun en gang på intakte hudprøver. Verdiene for TEWL etter skading av hudprøvene ble lagt i tabell 24.

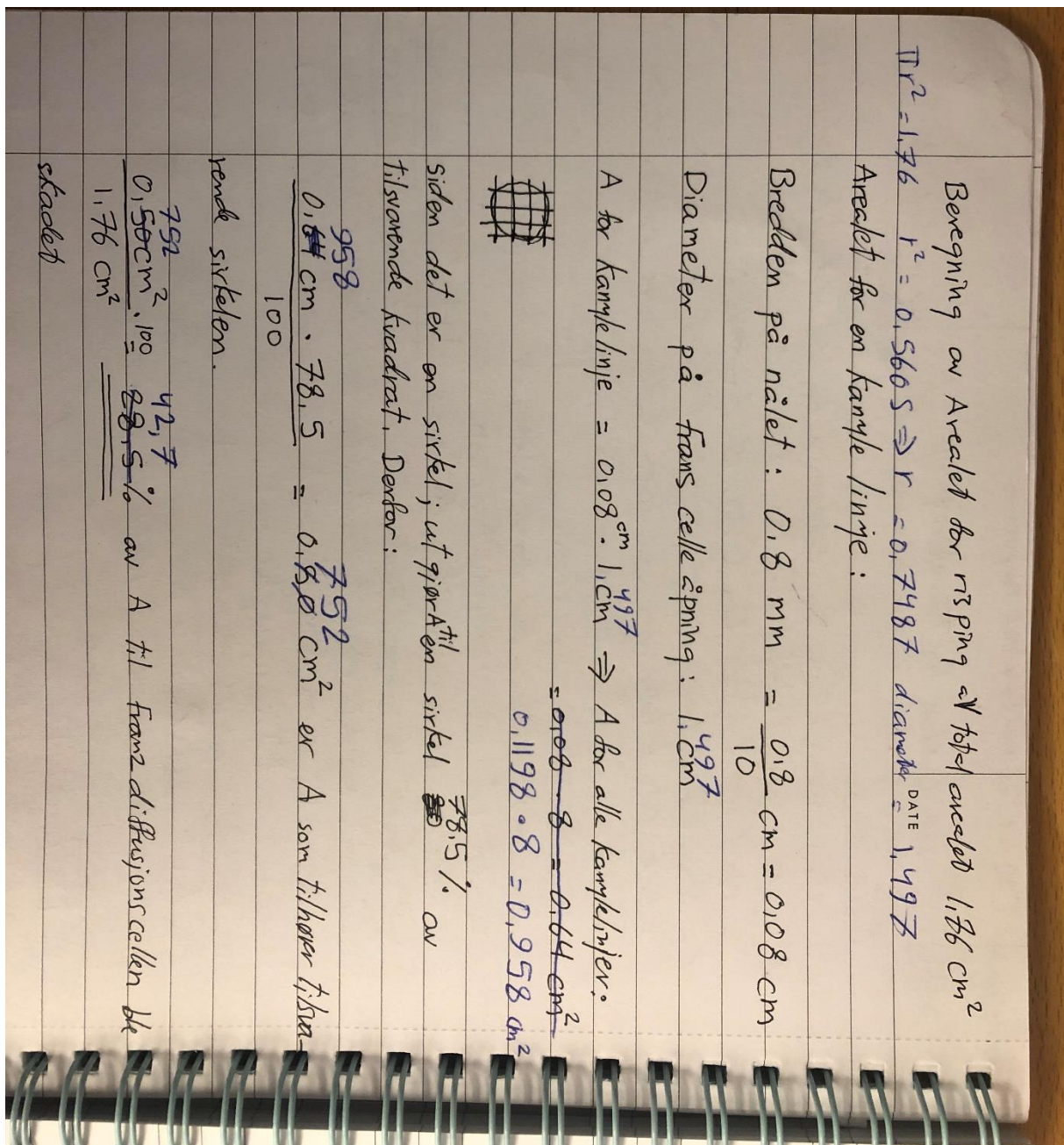
Tabell 24. Transepidermal vanntap målinger for hudprøvene som ble benyttet for opptak av ¹⁴C-metylparaben, etter behandlinger med ulike typer skader (3 målinger per hudprøve), gjennomsnitt og standardavvikverdiene.

Hudprøve	Behandling	TEWL 1 (g/m ²)	TEWL 2 (g/m ²)	TEWL 3 (g/m ²)	Gjennomsnitt (g/m ²)	Standardavvik
# A-40	Intakt	4,7			4,7	
# C-40	Teipskadet	12,7	11,8	11,6	12,0	0,59
# E-40	Rispet	13,8	17,4	14,2	15,1	1,97
# B-52	Intakt	5,4			5,4	
# D-52	Teipskadet	6,5	7,3	6,9	6,9	0,40
# F-52	Rispet	33,7	35,5	35	34,7	0,93
# K-51	Intakt	4			4,0	
# I-51	Teipskadet	52	46,5	41,7	46,7	5,15
# G-51	Rispet	31,1	33,2	33,4	32,6	1,27
# L-37	Intakt	6			6,0	
# J-37	Teipskadet	11,6	12	12,1	11,9	0,26
# H-37	Rispet	35,7	37,2	39,9	37,6	2,13

Fra tabell 23 og 24 vises det at TEWL verdiene økte 2-3 ganger etter skading med 10 3M Scotch teip biter, og 4-8 ganger etter risping med en 21G kanyle. I hudprøven som ble montert i cellen I, ble epidermis løsnet fra dermis under teipstrippingsprosedyren. TEWL verdiene ble ca. 5 ganger høyere enn TEWL verdiene for de andre teipstrippet hudprøvene.

8.6 Beregning av prosent arealet skadet ved risping

Figur 10 viser beregningen av prosent arealet skadet ved en 21G kanyle med en bredde på 0,08 cm. Skadet prosent arealet til hudprøvene ble beregnet til å være 42,7 %.



Figur 10. Beregning av prosent areal skadet ved risting med en 21 G kanyle (bredde 0,08 cm).

8.7 Diskusjon om Franz diffusjons cellesystem

Det finnes to hovedtyper diffusjonscellesystemer som benyttes i studiene for hudopptak av kjemikalier: statiske Franz diffusjonscellesystem og "flow-through" diffusjonscellesystem. Franz diffusjonscellesystemet er ofte en statisk cellesystem som har en fast volum og en kontrollert temperatur. Reseptorløsningen blandes kontinuerlig ved hjelp av en røremagnet (7). En "flow-through" diffusjonscellesystem kjennetegnes ved en kontinuerlig, automatisk erstatning av reseptorløsning, og mengde testkjemikaliet blir analysert automatisk. Dette

systemet kan mimikere blodgjennomstrømning i huden *in vivo* bedre enn Franz diffusjonscellesystemet (7).

I denne studien ble det brukt Franz diffusjonscellesystem til testing av hudopptak av ¹⁴C-testkjemikalier. Fordelene med statiske diffusjonsceller er:

- Et enklere i oppsett som gir færre tekniske utfordringer som ofte kan oppstå ved "flow-through" diffusjonscellesystemet som blant annet pumping av reseptorløsning, tilkoblingsproblemer (datamaskin) og testkjemikalier som kan feste seg i tubene i systemet (15).
- Bedre å bruke til å bestemme prosent gjenvinning av testkjemikaliet, da det er færre steder i apparatet hvor testkjemikaliet kan feste seg på (15).
- I tillegg tillater enkle designen i Franz (vertikale) cellesystemet, påføring av mange ulike typer (inkludert semifaste) løsemidler som inneholder testkjemikaliet på huden som for eksempel krem, i motsetning til horisontale diffusjonsceller hvor semifaste løsemidler ikke kan spres på huden (7, 15).
- Statisk cellesystemet er billigere og tilbyr større absorpsjonsareal til huden som gir bedre deteksjonsnivåer enn "flow-through" systemet (15).

En viktig ulempe ved statiske diffusjonscellesystem er at hvis konsentrasjonen til testkjemikaliet i reseptorkammeret overskrider 10 % av konsentrasjonen i donorkammeret, vil testkjemikaliet kunne diffundere saktere gjennom hudmembranen til reseptorkammeret (7). Dette vil da føre til underestimering av hudopptaket for testkjemikaliet.

I "flow-through" cellesystemet er det en kontinuerlig erstatning av reseptorløsning hvor reseptorløsningen kan være et næringsmedium til hudmembranen og strømmer gjennom reseptorkammeret med en hastighet på 1-2 ml/timen, noe som ligner på blodstrømmen *in vivo* (7, 15, 88). " Dette kan være en fordel når metabolismen av testkjemikaliet som skjer i huden under opptaksprosessen skal undersøkes (15, 88).

Selv om de to ulike forsøksmodellene har sine styrker og svakheter, viser en del studier som sammenligner de to systemene ingen forskjeller i verdiene for hudopptak av kjemikalier (15, 88-90).