

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Tomáš Hubka

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

In vitro test kožní penetrace jako alternativní test toxicity

Tomáš Hubka

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tomáš Hubka**
Osobní číslo: **C13432**
Studijní program: **B2807 Chemické a procesní inženýrství**
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**
Název tématu: **In vitro test kožní penetrace jako alternativní test toxicity**
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši o problematice kožní penetrace a jejího využití k alternativním testům toxicity.
2. Popište důvody zavádění alternativních testů toxicity.
3. Popište detailněji alternativní test toxicity OECD No. 428 z hlediska experimentálního i z hlediska vyhodnocení.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

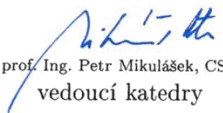
Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant bakalářské práce: **Dr. Ing. Zora Nývltová**
VÚOS
Datum zadání bakalářské práce: **30. ledna 2017**
Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 30. ledna 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 27. 6. 2017

Tomáš Hubka

Děkuji Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr., Ing. Zoře Nývltové, Dr. a Ing. Janě Volkové, za cenné rady, ochotu, pomoc a vstřícnost při zpracování bakalářské práce. Děkuji i kolektivu ve výzkumné skupině na pracovišti Analytika VUOS, jmenovitě děkuji Mgr. Karolíně Štochlové, Ing. Lucii Jakubcové, Bc. Lucii Biškové a Zbyňku Nývltovi za pomoc při závěrečné korekci bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval Doc. Ing. Miroslavu Pouzarovi, Ph.D., a Ing. Petře Plodíkové za pomoc při výběru tématu bakalářské práce. Malé poděkování patří také Bui Duong Thuy za pomoc při překladu odborných termínů v anglické literatuře. Také bych rád poděkoval Výzkumnému ústavu organických syntéz a.s. za poskytnuté zázemí. A v neposlední řadě děkuji své rodině, která mi poskytla nemalé finanční prostředky, které mi dovolily studovat na Univerzitě Pardubice.

ANOTACE

Bakalářská práce se zaměřuje na využití alternativních testů toxicity, konkrétně na test penetrace kůže prováděný *in vitro*. Dále pojednává o problematice, použití, důvodech zavádění alternativních testů toxicity a popisuje veškeré podmínky, které výrazně ovlivňují výsledek experimentu.

KLÍČOVÁ SLOVA

penetrace, kůže, toxikologie, alternativní testy toxicity, OECD No. 428

TITLE

In vitro skin penetration test as an alternative toxicity test

ANNOTATION

This thesis is aiming on the use of alternative toxicity tests, specifically on skin penetration test performed *in vitro*. It also deals with the problematics, utilization, reasons for the introduction of alternative tests of toxicity describes all the conditions that will affect the results of experiments.

KEYWORDS

penetration, skin, toxicology, alternative toxicity test, OECD No. 428

OBSAH

1	POPIS KŮŽE	14
1.1	Stavba kůže	14
1.1.1	<i>Epidermis</i>	15
1.1.2	<i>Dermis</i>	16
1.1.3	<i>Hypodermis</i>	16
1.2	Kožní adnexa.....	16
1.2.1	Holokrinní mazové žlázy	16
1.2.2	Ekrinní potní žlázy	16
1.2.3	Apokrinní aromatické žlázy	16
1.2.4	Vlasový aparát.....	16
2	FUNKCE KŮŽE	17
2.1	Ochranná funkce	17
2.1.1	Extracelulární prostor.....	17
2.1.2	Intracelulární prostor	18
2.1.3	Kožní bariéra	18
2.2	Metabolická aktivita.....	19
2.3	Termoregulační funkce	19
3.1	Rozdělení kožní absorpce	20
3.2	Mechanismus transportu	20
3.3	Transport látek kůží	21
3.3.1	Transcelulární průnik	21
3.3.2	Intercelulární průnik.....	21
3.3.3	Průnik vlasovým folikulem.....	21
3.3.4	Průnik mazovými a potními žlázami.....	21
4	METODIKA A STRUKTURA EXPERIMENTU	22
4.1	Difúzní komory	22
4.1.1	Typy difúzních komor dle specifikace	22
4.1.2	Typy difúzních komor dle použití.....	23
4.1.3	Validace difúzní komory.....	23
4.2	Receptorová kapalina.....	23
4.2.1	Podmínky pro použití.....	23
4.2.2	Příklady receptorových kapalin z praxe.....	23
4.3	Kožní preparáty.....	24
4.3.1	Lidská kůže	24
4.3.2	Anatomické rozdíly v lidské kůži dle dislokace a pohlaví.....	24
4.3.3	Zvířecí kůže.....	25

4.3.4	Modely kůže (umělá kůže).....	25
4.3.5	Příprava a charakteristika kožního preparátu.....	25
4.3.6	Rozdělení kožních preparátů.....	26
4.3.7	Skladování kožních preparátů.....	27
4.4	Integrita kožního preparátu.....	27
4.4.1	Vliv integrity preparátu na experiment.....	27
4.4.2	Kontrola integrity pomocí TEWL.....	27
4.4.3	Kontrola integrity pomocí TEER.....	28
4.4.4	Kontrola integrity pomocí TWF.....	28
4.4.5	Kontrola integrity pomocí BLUE.....	29
4.5	Testovaná látka.....	29
4.5.1	Příprava.....	29
4.5.2	Rozpouštědlo.....	29
4.5.3	Aplikace na kožní preparát.....	30
4.5.4	Vliv koncentrace na rychlost penetrace.....	30
4.5.5	Vliv velikosti částic na penetrační schopnost.....	30
4.6	Fyzikální podmínky experimentu.....	30
4.6.1	Teplota a vlhkost.....	30
4.6.2	Vliv teploty na rychlost penetrace.....	31
4.7	Experiment.....	31
4.7.1	Doba trvání expozice.....	31
4.7.2	Vzorkování.....	31
4.8	Koncové procedury.....	31
4.8.1	Vzorkování po ukončení experimentu.....	31
4.8.2	Odebírání strippů z kožního preparátu.....	32
4.8.3	Analýza vzorků z experimentu.....	32
5	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	33
5.1	Matematické vyhodnocení výsledků.....	33
5.1.1	Rozdělovací koeficient.....	33
5.1.2	Koeficient permeability.....	33
5.1.3	Tok.....	34
5.1.4	Kumulativní množství.....	35
5.1.5	Časové zpoždění.....	35
5.1.6	Kumulativní množství v závislosti na čase.....	36

6	LEGISLATIVA A VYUŽITÍ EXPERIMENTU V PRAXI	37
6.1	Cíl experimentu.....	37
6.2	Důvody zavádění experimentu.....	37
6.3	Koncept 3R	37
6.3.1	Nahrazení	38
6.3.2	Redukce.....	38
6.3.3	Vylepšení.....	38
6.4	Legislativa.....	39
6.4.1	Všeobecná legislativa.....	39
6.4.2	Legislativa kosmetického průmyslu.....	39
6.5	Další alternativní experimenty	40
6.5.1	<i>In silico</i> experimenty.....	40
6.5.2	<i>In vitro</i> experimenty	40
6.6	Využití experimentu.....	41
6.6.1	Farmacie	41
6.6.2	Toxikologie	41
6.6.3	Kosmetika	42
6.6.4	Agrochemie	42
7	DISKUZE.....	43
7.1	Volba materiálu.....	43
7.1.1	Difúzní komory	43
7.1.2	Zdroje kůže.....	43
7.1.3	Modely kůže.....	44
7.1.4	Receptorová kapalina	44
7.2	Volba metodiky experimentu.....	45
7.2.1	Kontrola integrity kožních preparátů	45
7.2.2	Podmínky experimentu	47
7.2.3	Vzorkování a koncové procedury	47
7.3	Srovnání různých výsledků a publikací	48
7.4	Shrnutí.....	50
8	ZÁVĚR	52
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	53

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 - Průřez lidskou kůží	14
Obrázek 2 - Jednoduchý průřez kůží	15
Obrázek 3 - Typy ceramidů	17
Obrázek 4 - Prostorové uspořádání ceramidů.....	18
Obrázek 5 - Schéma termoregulační funkce kůže	19
Obrázek 6 - Schéma dermální absorpce, názvosloví	20
Obrázek 7 - Tloušťka <i>stratum corneum</i> v závislosti na anatomické dislokaci.....	24
Obrázek 8 - Porovnání lidské kůže (A) s umělou kůží (B).....	25
Obrázek 9 - Histologické řezy kůže různé úrovně kvality.....	28

SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

Tabulka 1 - Rozdělení difúzních komor dle vybraných specifikací	22
Tabulka 2 - Porovnání statických a průtočných difúzních komor	22
Tabulka 3 - Porovnání kožních preparátů zhotovených z lidské a prasečí kůže	44
Tabulka 4 - Nejběžnější složení receptorových kapalin	45
Tabulka 5 - Porovnání výsledků experimentu dermální absorpce <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i>	48
Tabulka 6 - Porovnání výsledků experimentu dermální absorpce <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> kyseliny benzoové a kofeinu	49
Graf 1 - Kumulativní množství přes jednotku plochy v závislosti na čase.....	36
Graf 2 - Tok tritiové vody v závislosti na transepidermální ztrátě vody	46
Graf 3 - Koeficient permeability tritiové vody v závislosti na transepiteliální elektrické resistenci	47

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

REACH	Registration, evaluation and authorisation of chemicals (registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek)
EU	European union (Evropská unie)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)
WHO	World Health Organization (světová zdravotnická organizace)
No.	Number (číslo)
BSA	Bovine serum albumin (hovězí sérum albumin)
TEWL	Transepidermal water loss (transepidermální ztráta vody)
TEER	Transepithelial electrical resistance (transepiteliální elektrická rezistence)
TWF	Tritium water flux (tok tritiové vody)
3R	Reduce, replacement, refinement (redukce, nahrazení, zlepšení)
EURL	European Union Reference Laboratory (referenční laboratoř Evropské unie)
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods (evropské středisko pro validaci alternativních metod)
ECHA	European chemicals agency (evropská agentura pro chemické látky)
QSAR	Quantitative structure–activity relationship (kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou)
PBSM	Physiologically-Based Simulation Models (fyziologicky založené simulační modely)
ANN	Artificial neuron network (umělá neuronová síť)
3T3 NRU	<i>In vitro</i> neutral red uptake fototoxicity test (<i>in vitro</i> test fototoxicity, absorpce neutrálního červeného barviva)
CFU-GM	<i>In vitro</i> colony forming unit – granulocyte and macrophage progenitor (<i>in vitro</i> orgánově specifický test, jednotky tvořící kolonie granulocytů a makrofágů)
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (nesteroidní antiflogistika)
ST	Split thickness (rozdělená kůže)
FT	Full thickness (celá kůže)
HSE	Heat separated <i>epidermis</i> (tepelně separované <i>epidermis</i>)
RHE	Reconstructed human <i>epidermis</i> (rekonstruované lidské <i>epidermis</i>)
VUOS	Výzkumný ústav organických syntéz

ÚVOD

Téma práce bylo vybráno ke zpracování na základě velkého budoucího potenciálu v oborech toxikologie, agrochemie, farmakologie a kosmetika. Alternativní test penetrace kůže se vyvíjí již od poloviny 20. století. V budoucnu bude experiment dermální penetrace prováděný *in vitro* jediným použitelným experimentem testování průniku chemických látek do vnitřního prostředí organismu kůží. Přijatá legislativa již dnes nedovoluje používat experimenty *in vivo*, je-li dostupná ekvivalentní validovaná metoda *in vitro*.

V říjnu roku 2013 byl přijat návrh na legislativní rámec zajišťující bezpečnost chemických látek, jehož cílem je zlepšit ochranu životního prostředí, zdraví lidí a zvýšit inovační kapacity. V neposlední řadě legislativní rámec řeší i snížení počtu obratlovců, používaných v *in vivo* experimentech při testování systémové toxicity chemických látek. Dle zmíněného legislativního rámce, resp. politiky REACH, by měla být do roku 2018 dostupná toxikologická data pro všechny chemické látky vyráběné na území EU, nebo pro chemické látky, které se do EU dovážejí v množství větším, než je 1 tuna ročně. Do systému REACH spadá okolo 30 000 chemických látek, na jejichž toxikologické testování by bylo, dle odhadů, zapotřebí cca 9 mil. kusů obratlovců a není tak dlouhodobě udržitelné, z hlediska ekonomiky zdrojů a financí, provádět testování látek metodami *in vivo*.

Samotný experiment dermální absorpce chemických látek prováděný *in vitro* o systémovém účinku nic neříká, je pouze jedním článkem v baterii alternativních testů používaných na studium systémového účinku chemických látek. Poukazuje pouze na množství sledované látky schopné projít kůží do vnitřního prostředí organismu za jednotku času.

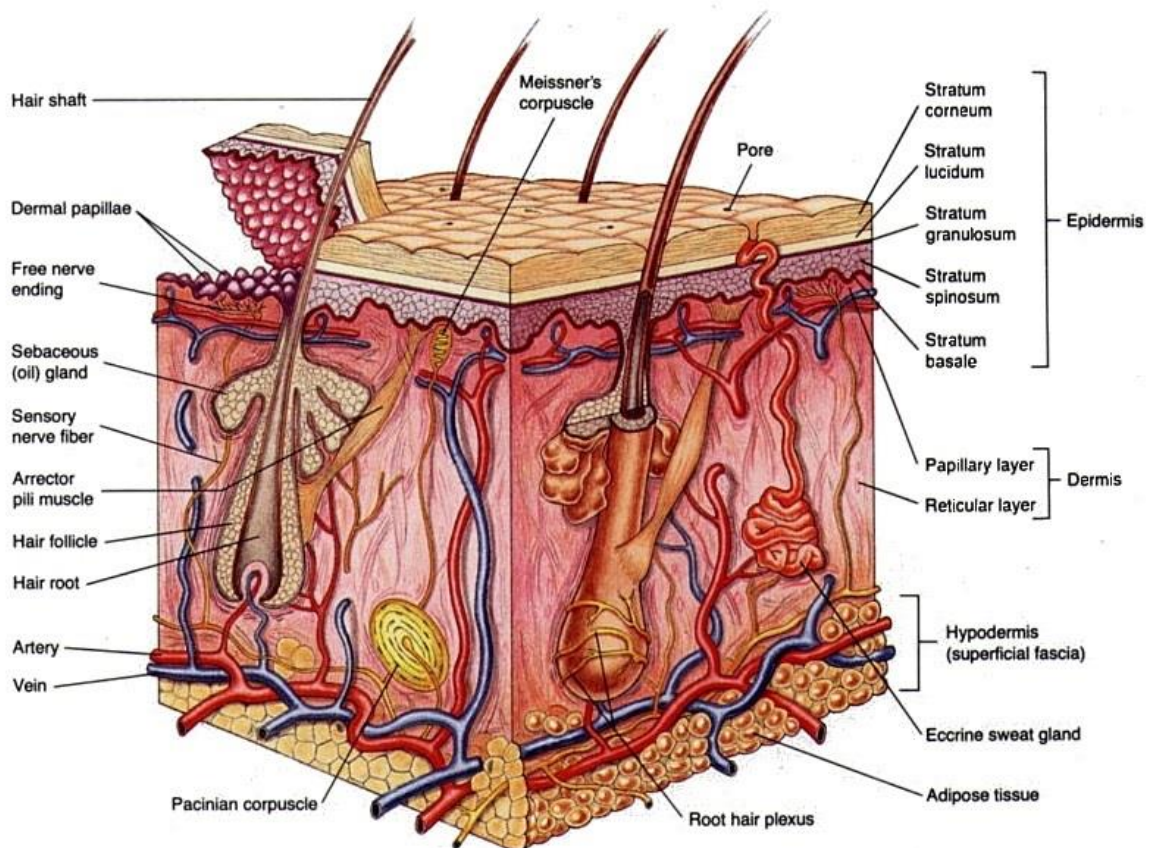
Cílem bakalářské práce je popis problematiky *in vitro* experimentu dermální absorpce. Práce pojednává o biologických a chemických základech stavby kůže, mechanismu průniku látek z vnějšího prostředí skrze kůži, experimentu samotném, všech faktorech, které mohou ovlivnit výsledek experimentu, matematické interpretaci získaných dat, legislativě a využití experimentu v praxi. Konkrétně v oborech farmakologie, toxikologie, agrochemie a kosmetika. V závěru práce jsou diskutovány všechny faktory, které zásadním způsobem ovlivňují experiment nebo mohou způsobit získání nesprávných dat.

1 POPIS KŮŽE

Kůže je orgán pokrývající těla obratlovců. Plocha kůže u dospělého člověka dosahuje 1,6 až 1,8 m², a to z ní dělá největší orgán lidského těla. Hmotnost kůže představuje cca 16 % celkové tělesné hmotnosti [1]. Kůže má významnou úlohu v ochraně organismu před působením zevních škodlivin. Podílí se na některých metabolických funkcích, je i významným senzitivním orgánem [2].

1.1 Stavba kůže

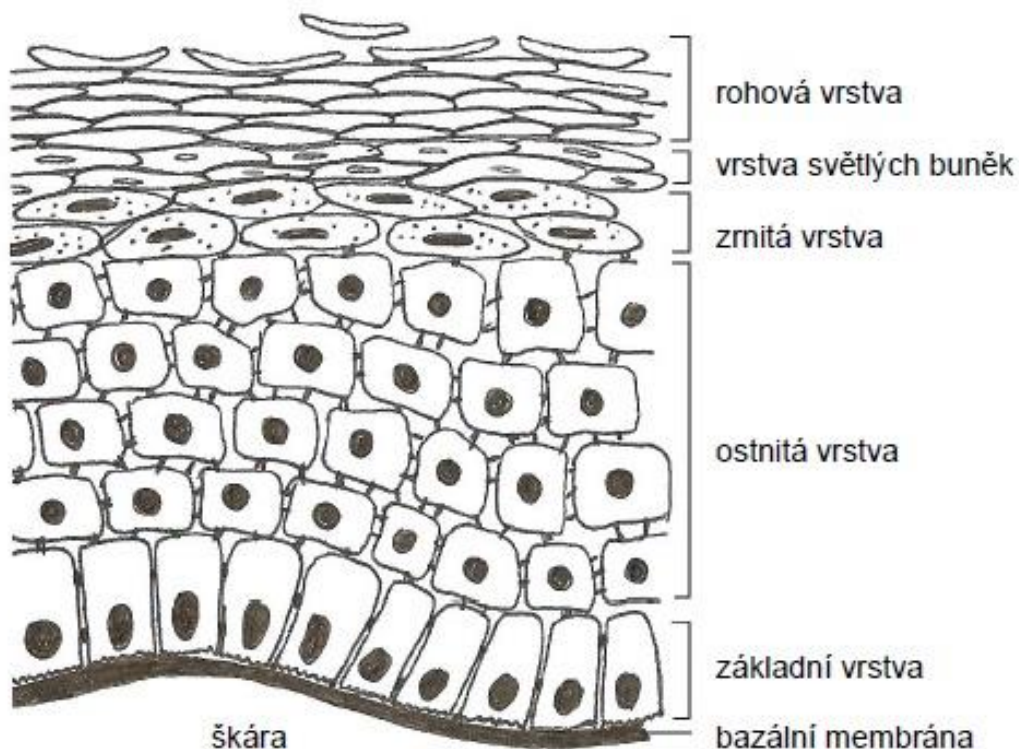
Kůže se dělí na vrstvu epidermální, dermální a hypodermální. Každá z těchto vrstev obsahuje rozdílné buněčné struktury (obrázek 1) mající nenahraditelnou funkci [3].



Obrázek 1 Průřez lidskou kůží [1]

1.1.1 Epidermis

V souboru vrstev zvaném *epidermis* najdeme vrstvu *stratum corneum* (rohová vrstva), která zajišťuje obranu před vnějšími chemickými, mechanickými a fyzikálními vlivy. Pod rohovou vrstvou je umístěno *stratum lucidum* (vrstva světlých buněk). Dále následuje *stratum granulosum* (zrnitá vrstva), která obsahuje množství seskupených ceramidů a fosfolipidů, které brání ztrátám tekutin z organismu. Vytvoření této bariéry bylo jedním z důležitých evolučních kroků, které umožnily rozvoj života na suché zemi. Další vrstvou je *stratum spinosum* (ostnitá vrstva), kde probíhá obnova buněk *epidermis*, které se zde mitoticky dělí. Lidské buňky se obměňují každých cca 15-30 dní, kdy rychlost tohoto procesu je převážně ovlivněna věkem jedince a dislokací buněk na těle. Poslední vrstvou je *stratum basale* (základní vrstva), kde nacházíme systém hemidesmozomů, které přispívají k pevnému připojení buněk k bazální membráně (někdy se používá název bazální lamina, obrázek 2). Buňky lokalizované ve *stratum basale* se často mitoticky dělí a přispívají k obnově *epidermis*. *Stratum basale* dohromady se *stratum spinosum* se někdy sumárně označují jako *stratum terminativum malpighi* (malpighická vrstva) [3].



Obrázek 2 Jednoduchý průřez kůže [3]

1.1.2 Dermis

V souboru vrstev zvaném *dermis*, v češtině škára, najdeme nejprve vrstvu *stratum papillare*. Jedná se o tenké seskupení řídkého kolagenního vaziva a kotvící fibrily, které zajišťují vzájemné spojení *dermis* a *epidermis*. Důležitou vrstvou je *stratum reticulare*, která je tvořena hustým neuspořádaným kolagenním vazivem, které je odpovědné za elastické vlastnosti kůže [4].

1.1.3 Hypodermis

Tento soubor buněčného seskupení umožňuje spojení *dermis* a *epidermis* se svalovou *fascií*, *periostem* nebo *perichondriem*. Nalezneme zde podkožní tukové vazivo, místy svazky hladkého svalstva, nebo například na obličejí snopce příčně pruhovaného svalstva [4].

1.2 Kožní adnexa

1.2.1 Holokrinní mazové žlázy

Dislokují se ve vazivové vrstvě kůže a obvykle jsou integrovány na vlasový aparát, ale samostatně je můžeme nalézt na očním víčku. Vylučují na povrch kůže tukový sekret, který obsahuje směs triacylglycerolů, vosků, skvalen, cholesterol a jeho estery [4].

1.2.2 Ekrinní potní žlázy

Nachází se téměř po celém těle a jejich sekreční část je ukotvena v *dermis* a ústí až na povrch kůže nerozvětvenými vývody. Sekret potní žlázy je řídké konzistence a obsahuje minimum proteinů, vodu, chlorid sodný, močovinu, amoniak a kyselinu močovou [4].

1.2.3 Apokrinní aromatické žlázy

Stavbou se podobají ekrinním potním žlázám, jsou však větší a vyúsťují krátkými vývody do vlasových folikulů. Sekret je viskózní konzistence, obsahuje převážně proteiny, aromatické látky a minimum lipidů [4].

1.2.4 Vlasový aparát

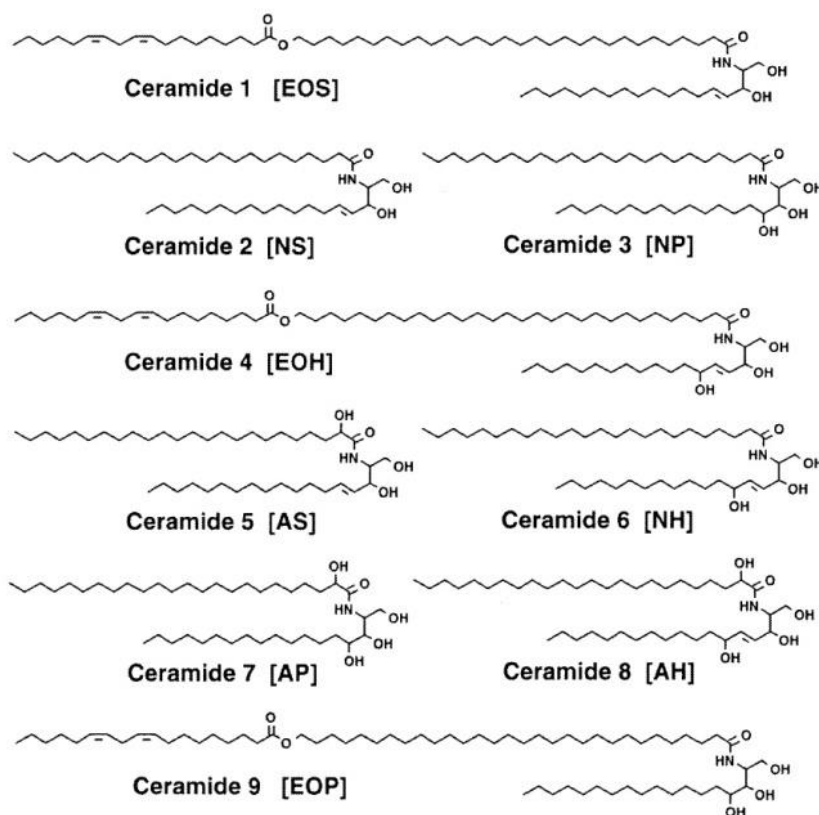
Část vlasu ústící z kůže se nazývá *scapus pili*. Zanořená část vlasu je kořen vlasu neboli *radix pili*, který je na konci ztluštěn a tvoří tak vlasovou cibulku neboli *bulbus pili*. Kořen vlasu a vlasová cibulka obalená epitelovou pochvou tvoří v *epidermis* tzv. vlasový folikul. Do vlasové cibulky ústí dermální papila s cévami, které zajišťují výživu vlasového folikulu [4].

2 FUNKCE KŮŽE

2.1 Ochranná funkce

2.1.1 Extracelulární prostor

Stratum corneum nacházející se v *epidermis* je, co se týče bariérové funkce kůže, nenahraditelné. Extracelulární prostor obsahuje 45-50 % hm. ekvimolární kompozice ceramidů, 25 % hm. cholesterolu, 10-15 % hm. volných mastných kyselin a pod 5 % hm. různých derivátů lipidů, např. sulfát cholesterolu. Ceramidy (obrázek 3) hrají v ochranné funkci kůže zásadní roli, protože tvoří kontinuální fluidní membránu (fluiditu membrány ovlivňuje přítomnost cholesterolu). Tato membrána je méně fluidní a méně propustná než fosfolipidová dvojvrstva [5]. Obecně se molekula ceramidu skládá z polární hlavy a dvou hydrofobních řetězců, které se stavbou podobají fosfolipidům, běžně přítomných ve většině buněčných membrán. Zásadním rozdílem mezi molekulou ceramidu a fosfolipidu je velikost polární hlavy, která je výrazně menší u ceramidu, což umožňuje těsnější uspořádání. Dalším rozdílem u ceramidů je podstatně delší hydrofobní řetězec, oproti fosfolipidům tvoří několikvrstvé a vzájemně propojené lamelární struktury [6].



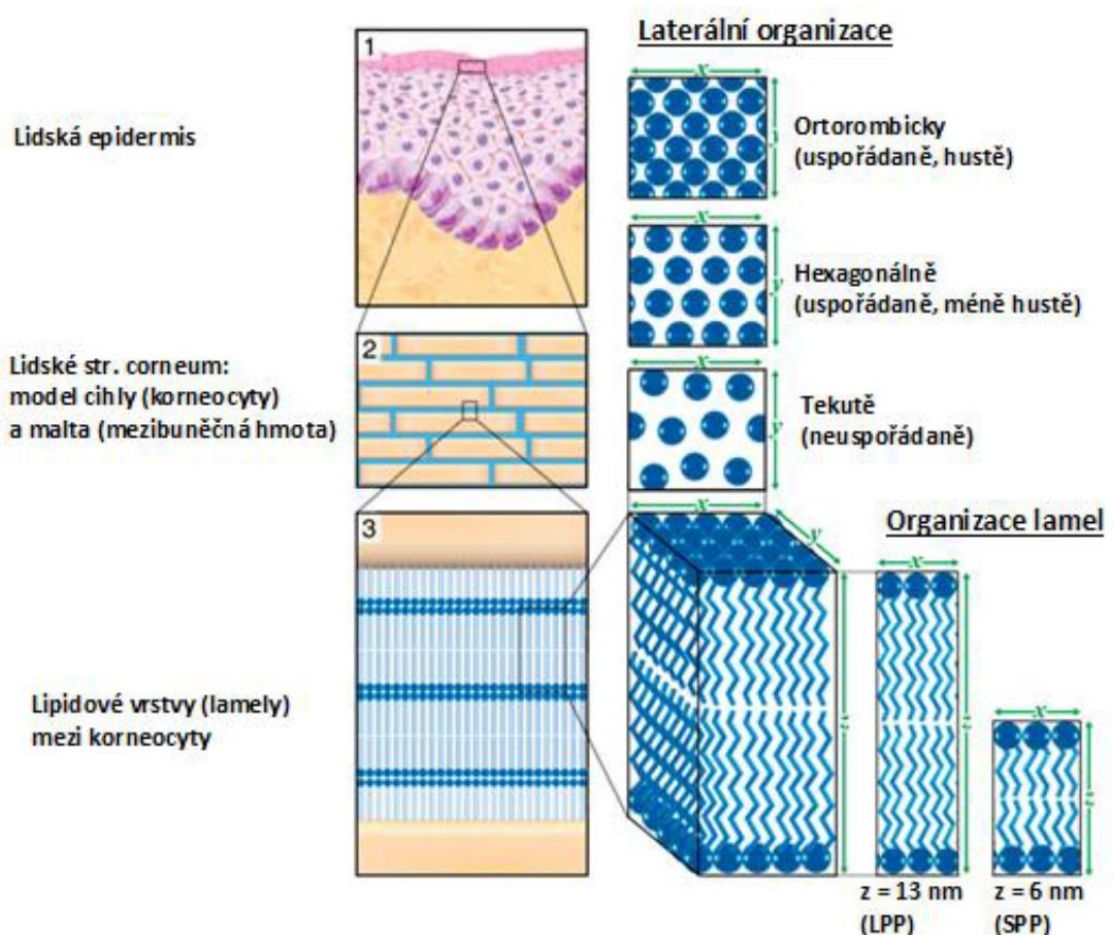
Obrázek 3 Typy ceramidů [5]

2.1.2 Intracelulární prostor

Celkovou vitalitu pokožky zajišťuje několik vrstev odumřelých, tzv. zrohovatělých, keratynocytů nacházejících se ve *stratum corneum* [7]. Chemicky se jedná o buňku obsahující hlavně skleroprotein keratin, který se skládá nejméně z šesti různých polypeptidů [8]. Buňka je na periferii obalena tzv. zrohovatělým obalem, který je tvořen převážně proteiny involucrin, loricrin a enzymy. Vnější stranu obalu tvoří vrstva kovalentně vázaných hydroxyceramidů, které tvoří dlouhé řetězce a souhrnně se nazývají lipidová obálka [5].

2.1.3 Kožní bariéra

Struktura uspořádání zrohovatělých korneocytů a ceramidových lamel je vyobrazena níže (obrázek 4). Díky tomuto uspořádání *stratum corneum* je organismus chráněn před ztrátou vody a nepříznivými vlivy zevních škodlivin, bakterií, virů nebo třeba plísní [7].



Obrázek 4 Prostorové uspořádání ceramidů [8]

2.2 Metabolická aktivita

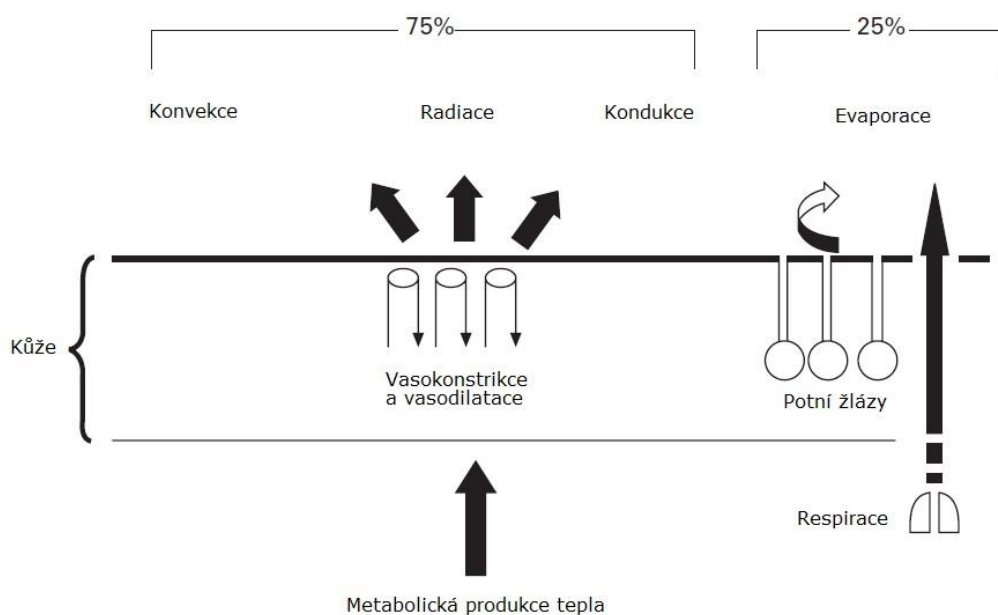
Kůže, největší orgán lidského těla a první místo kontaktu pro mnoho vnějších podnětů, chrání tělo několika způsoby. Jeho bariérová funkce určuje lokální a systémovou biologickou dostupnost dermálně aplikované látky. Dříve byla kůže popsána pouze jako fyzická permeabilní bariéra. Nicméně, dnes již víme, že kůže má také schopnost metabolizovat *xenobiotikum* [9].

Vysokou metabolickou aktivitu ve fázi I vykazují enzymy CYP1A1, CYP2E1, CYP2S1, FMO1, FMO5 a mezi vysoce aktivní enzymy ve fázi II patří NAT1, UGT1A10 a GSTP1.

Experimentálně bylo dokázáno, že více enzymaticky aktivní je soubor vrstev *epidermis* a to konkrétně o polovinu než soubor vrstev *dermis* [9].

2.3 Termoregulační funkce

Člověk udržuje svoji základní teplotu v poměrně úzkém intervalu mezi 36-38 °C. Vychýlení nad nebo pod tento interval může způsobit zdravotní komplikace, v extrémním případě i smrt jedince. Kůže je hlavním orgánem, který řídí tělesné teplo, vlhkost a tok tepla pomocí tepelných receptorů, což jsou další adnexa dislokovaná v kůži. Výměňkový mechanismus přenosu tepla pomocí povrchu kůže patří mezi účinné metody termoregulace. Mezi hlavní principy termoregulace patří vedení tepla, konvekce a radiace (dlouhovlnná a krátkovlnná radiace), dále také latentní přenos tepla pomocí odpařování a difúzí vlhkosti a odpařování potu na povrchu kůže (obrázek 5) [10].

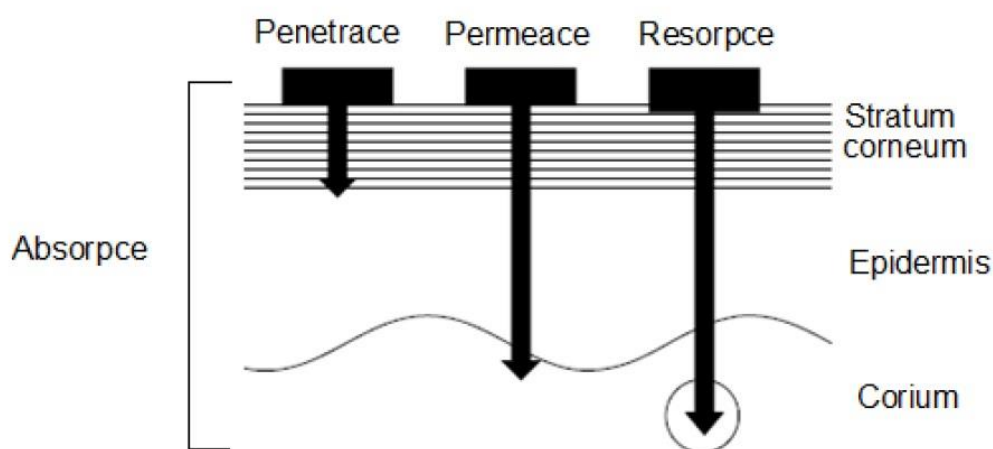


Obrázek 5 Schéma termoregulační funkce kůže [10]

3 MECHANISMUS PRŮNIKU LÁTEK

3.1 Rozdělení kožní absorpce

Průnik chemických látek kůží probíhá v několika stupních. Používané názvosloví se v označení jednotlivých stupňů liší. Novějšího popisu průniku látky do organismu používá OECD a následně i WHO. Dle těchto institucí je dermální absorpce globální, resp. obecný termín, který popisuje celou cestu přenosu látky z vnějšího povrchu kůže do krevních nebo lymfatických cév organismu. Absorpci proto dále rozdělují dle názvosloví: penetrace – vstup látky do rohové vrstvy, permeace – přestup látky do další, strukturálně odlišné vrstvy kůže, resorpce – vstup látky do kožních lymfatických nebo krevních cév [3].



Obrázek 6 Schéma dermální absorpce, názvosloví [8]

3.2 Mechanismus transportu

Převážná část chemických látek prochází intercelulární cestou přenosu, menší množství látek prochází transcelulární cestou. Průnik látek cestou vlasových folikul a vývodů potních žláz má spíše druhořadý význam, s výjimkou expozic ochlupené části organismu a stavů hypertrichózy. Penetrace látek kůží je obvykle považována za proces pasivní difúze. Existují i mechanismy vstupu za pomoci aktivní difúze, ale pro pochopení dějů, které se uplatňují při testu OECD No. 428 nám postačí popis cest průniku kůže za pomoci pasivní difúze a osmózy [3].

3.3 Transport látek kůží

Kůže je málo propustná pro většinu plynů a tekutin, tím napomáhá k udržení homeostázy. Chemické látky nejčastěji vnikají do organismu přes kůži: transcelulárně, intercelulárně, vlasovým folikulem, mazovými žlázami a potními žlázami [3].

3.3.1 Transcelulární průnik

Při expozici kůže proniká látka do vnitřního prostředí organismu nejčastěji transcelulárně, tzn. skrze těla buněk *stratum corneum* a buněk zbývajících vrstev *dermis* [11]. Tato cesta průniku je pro penetraci látek značně nevýhodná, neboť látky při ní prochází nejen přes hydrofobní intercelulární prostor, ale i skrz hydrofilní vnitřní prostředí buněk. Způsob tohoto průniku se předpokládá zejména u hydrofilních látek [8].

3.3.2 Intercelulární průnik

Pojmem intercelulární průnik rozumíme transport látek mezibuněčnými prostory, např. skrz ceramidové lamely [11]. Většina látek prochází intercelulární cestou přenosu, která je typická zejména pro lipofilní látky [8].

3.3.3 Průnik vlasovým folikulem

Kůže obsahuje mnoho vlasových folikul, proto nelze zanedbat průnik látky do vnitřního prostředí organismu i touto cestou. Samotné vlasové folikulum je součástí vlasového váčku s potní žlázou, mazem a pokožkou. Nové práce však ukazují na významný podíl této cesty při penetraci látek, zejména pro hydrofilní molekuly [8,12,13,14].

3.3.4 Průnik mazovými a potními žlázami

Mazové žlázy jsou dislokovány ve škáře a jsou spojeny s vlasovým folikulem. V některých případech se nachází i mimo něj, a to zejména na místech, kde ochlupení chybí, např. lidské oční víčko [4]. Potní žlázy se nacházejí téměř po celém těle a odhadem jich je něco mezi 2,5 miliony [15].

4 METODIKA A STRUKTURA EXPERIMENTU

4.1 Difúzní komory

Difúzní komora, resp. difúzní systém, se skládá z donorové a receptorové části a mezi nimi je umístěn kožní preparát. Celý systém by měl zajišťovat dobré utěsnění kožního preparátu, snadné vzorkování receptorové kapaliny, dobrou interakci receptorové kapaliny se spodní stranou kůže a možnost rychlého řízení teploty buněk přenosem tepla. V praxi se používají statické a průtokové difúzní komory. Za normálních okolností mohou zůstat donorové komory otevřené během expozice, ale při testování těkavých látek se musí uzavřít např. parafinem [16].

4.1.1 Typy difúzních komor dle specifikace

Difúzní komory mohou být klasifikovány dle designu, pozice kožního preparátu, konstrukčního materiálu, či jiných vlastností.

Tabulka 1 Rozdělení difúzních komor dle vybraných specifikací [17]

Design:	statická, průtočná
Pozice:	horizontální, vertikální
Materiál:	čiré sklo, tmavé sklo, teflon
Ostatní vlastnosti:	automaticky míchaná, s víčkem v donorové části, atp

V praxi se setkáme především se statickou Franzovou vertikální komorou z čirého skla, nebo v menším počtu se Scott-Dickovou průtočnou komorou z čirého skla. V roce 1984 provedli Bronaugh a Stewart experiment, ve kterém porovnávali statické a průtočné komory. Výsledky vykazují malé odchylky, které ale nejsou zásadní [18].

Tabulka 2 Porovnání statických a průtočných difúzních komor [18]

Látka	Typ komory	
	Průtočná komora [%]	Statická komora [%]
Voda	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,2
Kortizon	8,5 ± 0,9	6,3 ± 0,8
Benzoová kyselina	45,9 ± 7,6	48,6 ± 3,8

Výsledky (tabulka 2) jsou vyjádřeny jako prošlé procento z aplikované dávky.

4.1.2 Typy difúzních komor dle použití

V praxi se rozlišuje objem testované látky na metodu konečné dávky nebo metodu nekonečné dávky a ke každé metodě se používají specifické typy difúzních komor. Pro metodu konečné dávky lze použít vertikální Franzovu difúzní komoru nebo průtočnou komoru, zatímco u metody nekonečné dávky se používá statická horizontální difúzní komora. Metoda nekonečné dávky skrývá některá úskalí, jako je ovlivnění toku testovaných látek, kdy důvodem může být smočení obou stran kožního preparátu [17].

4.1.3 Validace difúzní komory

Validace difúzních komor je důležitá z pohledu intra-laboratorní a inter-laboratorní variability výsledků, které mohou být zatíženy chybou v důsledku různých konstrukčních vlastností samotné difúzní komory. Touto obsáhlou problematikou se zabývá práce autorů Shioh-Fern a kol. [19].

4.2 Receptorová kapalina

4.2.1 Podmínky pro použití

Vhodnou volbou je použití fyziologicky příznivé receptorové kapaliny, ale mohou být použity také jiné kapaliny za odůvodněného předpokladu (např. rozpustnost testované látky). Před použitím v experimentu by mělo být stanoveno přesné složení receptorové kapaliny a měla by být také prokázána adekvátní rozpustnost testované látky. Její nedostatečná rozpustnost nesmí během testu působit jako bariéra. Receptorová kapalina nesmí mít vliv na integritu kožního preparátu. Při použití statické difúzní komory se musí receptorová kapalina neustále míchat. Pokud je studována penetrace na metabolicky aktivním kožním preparátu, musí receptorová kapalina podporovat její životaschopnost po celou dobu experimentu [16].

4.2.2 Příklady receptorových kapalin z praxe

V běžné praxi se nejčastěji používá, kompozice, jejíž základem je fyziologický roztok (0,9% roztok NaCl). Ten nejlépe simuluje přirozené prostředí lidského těla a lidské krve. pH fyziologického roztoku se upravuje pomocí fosfátového pufru na hodnotu 7,4, což odpovídá pH lidské plazmy za normálních podmínek [20]. Bohužel čistý fyziologický roztok i po úpravě na pH 7,4 není vhodnou volbou pro studium penetrace lipofilních látek. Nejběžněji se proto přidává k fyziologickému roztoku mezi 5-20 % hm. BSA nebo 6 % hm. Volpo 20 [21].

4.3 Kožní preparáty

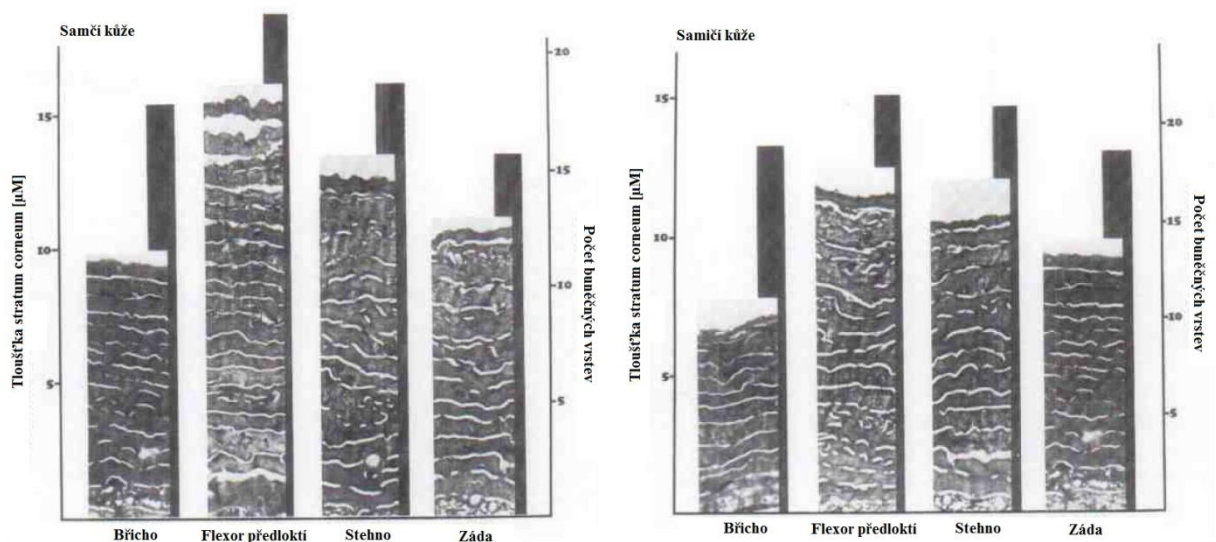
4.3.1 Lidská kůže

Vzorky lidské kůže jsou získávány obvykle z tkáňové banky nebo přímo od živých dárců, většinou pacientů po chirurgických operacích. Zde je nezbytný informovaný souhlas dárce k použití kůže v experimentech [8]. Použití lidské kůže k experimentu je vázáno na povolení etické komise, a proto se používají především kůže ze zvířecích zdrojů [16].

4.3.2 Anatomické rozdíly v lidské kůži dle dislokace a pohlaví

Anatomické rozdíly ve vrstvách kůže mohou do značné míry ovlivňovat test kožní penetrace. Dvojice autorů Dao Jr., Kazin, se ve své práci zabývala podrobným popisem rozdílů v lidské kůži v závislosti na aktivitě hormonů, typických pro jednotlivá pohlaví (obrázek 7). Studie na zvířatech uvádí rozdíly v kůži mezi pohlavími. Myši samci mají o 190 % silnější *dermis*, ale zároveň tenčí *epidermis* a *hypodermis* než myši samice. Ve výsledku je samčí kůže o 40 % silnější než samičí [22].

Tloušťka kůže je také ovlivněna věkem. Relativně nejtlustší kůži má člověk okolo 35. roku života, naopak ztenčovat se začíná okolo 65. roku života. Dalším faktorem, který ovlivňuje tloušťku kůže, je dislokace samotné kůže [23].



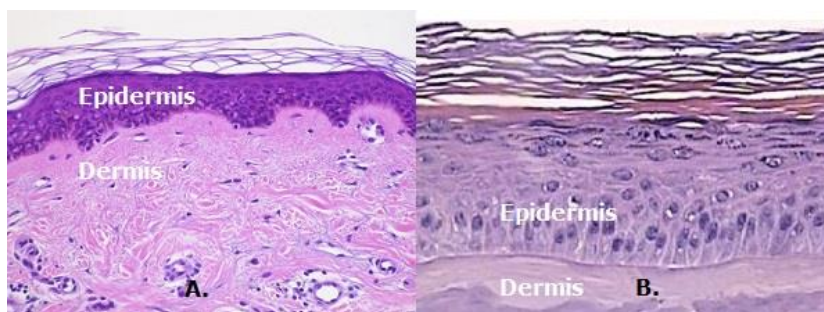
Obrázek 7 Tloušťka *stratum corneum* v závislosti na anatomické dislokaci [23]

4.3.3 Zvířecí kůže

Nejvhodnější je použití kůže ze zvířete druhu Prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*). Při vhodném výběru anatomického místa je vepřová kůže nejpodobnější té lidské. Navíc je výběr tohoto zdroje vhodný i z ekonomických důvodů, protože se dají použít odpady z potravinářského průmyslu, konkrétně z jatek [8].

4.3.4 Modely kůže (umělá kůže)

Práce autorů Schäfer-Korting a kol., se zabývá prevalidační studií testu OECD No. 428, kde bylo místo kožního preparátu použito RHE. V práci jsou konkrétně zmíněny RHE preparáty: EpiDerm™ (MatTek, USA), Episkin® (L'Oréal, France), SkinEthic® (SkinEthic, France). Práce v závěru popisuje nevhodnost použití RHE pro testy kožní penetrace z důvodů nižší koncentrace volných mastných kyselin a ceramidových lamel ve *stratum corneum* [24].



Obrázek 8 Porovnání lidské kůže (A) s umělou kůží (B) [vlastní tvorba]

4.3.5 Příprava a charakteristika kožního preparátu

Extrakce kožního preparátu se provádí několika postupy: enzymaticky, tepelně, chemicky a mechanicky. Vhodný postup extrakce se volí dle zvolené tloušťky kožního preparátu. Pokud chceme připravit kožní preparát, který obsahuje pouze vrstvu *stratum corneum*, využijeme metody separace pomocí enzymu nebo tepla. Jestliže chceme připravit kožní preparát, který obsahuje všechny vrstvy *epidermis* tzv. plná tloušťka, je vhodné ho separovat mechanicky pomocí skalpelu. V protokolu experimentu musí být vždy odůvodněna preparativní technika, výběr druhu a anatomického místa odkud byl kožní preparát extrahován [16]. V některých experimentech jsou použity dermatomované kožní preparáty o celkové tloušťce 200-500 μm . Kožní preparáty se takto připraví elektrickým nebo pneumatickým dermatomem [25,17].

4.3.6 Rozdělení kožních preparátů

Celá kůže

Obsahuje soubor vrstev *epidermis* a *dermis*, je zbavený subkutánního tuku, připravuje se nejčastěji extrakcí skalpelem [25,17]. Celá kůže je vhodná pro testování hydrofilních látek, naopak není vhodná pro testování látek lipofilních, které se budou absorbovat v souboru vrstev *dermis* [17].

Rozdělená kůže

Obsahuje soubor vrstev *epidermis* a zhruba polovinu *dermis*, nejčastěji se připravuje pomocí dermatomu [25,17]. Popis přípravy viz dermatomovaná kůže.

Tepelně separované epidermis

Obsahuje pouze soubor vrstev *epidermis*, připravuje se tepelnou extrakcí ve vodní lázni. Preparáty jsou připraveny z celé kůže. Do vodní lázně vyhřáté na 58-60 °C se ponoří celá kůže po dobu 60 sekund, pak se jemně odloupne *epidermis* od *dermis* za použití pinzety [26]. Kožní preparáty obsahující pouze vrstvu *epidermis*, jsou vhodné pro studium dermální absorpce jak hydrofilních látek tak lipofilních [25,17].

Dermatomovaná kůže

Obvyklá tloušťka je 200-500 μm, může obsahovat pouze *epidermis* nebo *epidermis* společně s částí *dermis*, viz rozdělená kůže. Extrahuje se pomocí dermatomu nebo humbyho nože [25,17]. Samotná extrakce se provede nastavením výšky čepele, zapne se napájení přístroje a vyzkouší se funkčnost před kontaktem s kůží. Příklad se pevně přitiskne ke kůži pod úhlem 45°, samotný řez se vede pohybem směrem dolů na odběrovém místě tak, aby se udržela konstantní výška preparátu. Napájení se vypíná až po extrakci preparátu z místa odběru, kdy celý pohyb evokuje přistání a opětovný vzlet letadla. V případě humbyho nože se extrakce provádí následujícím způsobem. Nastaví se odsazení čepele nože pomocí tloušťkoměru, čepel se přiloží ke kůži pod úhlem 45° a pozvolným pohybem zpět a dopředu se vede řez. Pokud máme dostatečnou délku preparátu, odřízneme ho skalpelem u čepele použitého nože [27]. Takto připravený preparát, obsahující pouze vrstvu *epidermis*, je vhodný pro studium dermální absorpce jak hydrofilních látek, tak lipofilních. Obsahuje-li společně s *epidermis* i soubor vrstev *dermis*, není již tak vhodný pro studium lipofilních látek [17,28].

Izolované *stratum corneum*

Obsahuje pouze nejsvrchnější vrstvu *stratum corneum* a připravuje se enzymaticky nebo chemicky. Tento kožní preparát se připraví z dermatomované kůže, která se umístí na filtrační papír namočený ve fyziologickém roztoku o pH 7,4 (pufrovaným pomocí fosfátového pufru) a 0,05% trypsinu, po dobu dvou hodin a při teplotě 37 °C [29]. Jako alternativa se mohou použít pro separaci enzymy: kolagenáza, pronáza, pankreová elastáza, plísňová elastáza a keratináza [30].

Zbývající aktivita trypsinu se zablokuje ponořením vzniklého *stratum corneum* do 0,05% trypsinového inhibitoru (typ II) a následně se *stratum corneum* dvakrát promyje čistou vodou. Pokud se skladuje, tak se nejdříve usuší a uloží nad silikagel při pokojové teplotě [29]. Izolované *stratum corneum* je vhodné pro testování lipofilních i hydrofilních sloučenin [17].

4.3.7 Skladování kožních preparátů

V literatuře se nejčastěji setkáváme se zamražením hotových kožních preparátů nebo jenom kůže zbavené subkutánního tuku v hliníkové folii při teplotě -20 °C po dobu maximálně 6 měsíců. Před použitím je doporučeno nechat kožní preparát aklimatizovat při teplotě 4 °C [25,31,32].

V některých dokumentech se setkáme i s nižší skladovací teplotou, např. -70 °C [33]. Při této skladovací teplotě hrozí anatomické poškození kůže, které je způsobené krystalizací vody [8].

4.4 Integrita kožního preparátu

4.4.1 Vliv integrity preparátu na experiment

Je nezbytné, aby byla zachována celistvost kožního preparátu. Nevhodné zacházení může vést k poškození kožní bariéry, tj. *stratum corneum*, proto musí být kožní preparát kontrolován vždy před začátkem experimentu [16].

4.4.2 Kontrola integrity pomocí TEWL

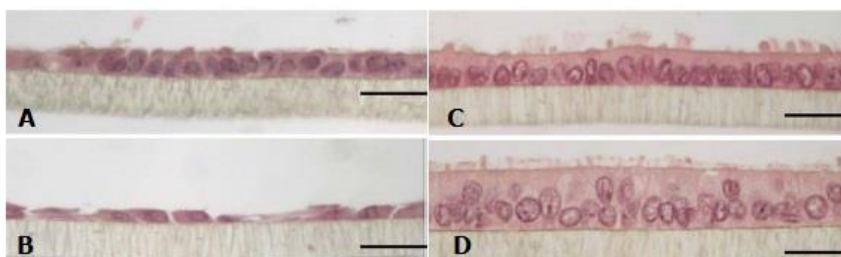
Transepidermální ztráta vody (TEWL) je neinvazivní metoda, při které se sleduje konstitutivní vypařování páry z kůže za inaktivity potních žláz [34]. Měření se provádí RH metrem nebo obdobou tewametrem na sestavené a vytemperované difúzní komoře s kožním preparátem. V receptorové části difúzní komory je přítomna receptorová kapalina, nad donorovou částí difúzní komory je umístěna sonda RH metru. Samotný RH metr sbírá data

v různých časových intervalech. Výsledek může být vypočítán na základě měření gradientu tlaku vodní páry na povrchu kůže, který je považován za konstantní. Měřenou veličinou je odpar vody za jednotku času [35]. Nepoškozená kůže s plně funkční bariérou *stratum corneum* má nižší hodnoty TEWL, než kůže s poškozenou korneální bariérou [8].

4.4.3 Kontrola integrity pomocí TEER

Transepiteliální elektrická resistence (TEER) je další neinvazivní používanou metodou kontroly integrity kožní bariéry. Tato metoda je nejvhodnější pro sledování integrity *stratum corneum*, ale pro kožní preparáty v plné tloušťce (FT) se hodí méně kvůli vysokým hodnotám odporu [36]. Měření se provádí LCR metrem s dvojicí nerezových elektrod (alespoň 50 mm dlouhé), kdy měřenou veličinou je elektrický odpor při frekvenci 100 kHz. Samotné měření se prakticky provádí na připravené a vytemperované difúzní komoře s kožním preparátem, kde se jedna elektroda vsune vzorkovacím ramínkem do receptorové části difúzní komory a druhá elektroda se vloží do donorové části difúzní komory a nesmí se dotýkat kožního preparátu. Receptorovou a donorovou kapalinou je zde fyziologický roztok, který plní funkci vodiče 2. řádu tzv. elektrolytu [37].

V práci autorů Chen, Einspanier a Schoen [38] jsou uvedeny hodnoty pro kůži s nepoškozenou bariérovou funkcí, které se pohybují v intervalu $R = 500-1100 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Kožní preparáty, s hodnotou jinou než v uvedeném intervalu, vykazovaly nízkou morfoloickou kvalitu (obrázek 10).



Obrázek 9 Histologické řezy kůže různé úrovně kvality [38]

4.4.4 Kontrola integrity pomocí TWF

Tok tritiové vody (TWF) je další metodou nejčastěji používanou pro kontrolu integrity kožní bariéry. Metoda TWF je vhodná pro sledování stavu integrity všech typů kožních preparátů. K samotnému měření se používá tritiová voda ($^3\text{H}_2\text{O}$) o známé aktivitě rozpadů za jednu sekundu. Do donorové části připravené a vytemperované difúzní komory s kožním preparátem se přidá definované množství tritiové vody a odebírají se vzorky receptorové

kapaliny (v tomto případě fyziologický roztok) ve vhodných intervalech. Analýza vzorků receptorové kapaliny se provádí metodou kapalinové scintilační detekce (LSC). Jedná se o rychlou metodu, bez nutnosti úpravy vzorků k měření. Vyhodnocení se provede výpočtem koeficientu permeability (viz bod 5.1.2). Nepoškozené kožní preparáty v případě plné tloušťky kůže mají hodnotu koeficientu permeability okolo $K_p = 9,23 \pm 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$, v případě epidermálních membrán mají hodnotu koeficientu permeability okolo $K_p = 6,92 \pm 2,7 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ [39]. Tato metoda kontroly integrity je doporučena ke kontrole kožní integrity během testování za použití tritiové vody jako vnitřního standardu [40].

4.4.5 Kontrola integrity pomocí BLUE

Tok methylenové modři (BLUE) je invazivní metodou kontroly kožní integrity po skončení experimentu dermální absorpce. Po koncových procedurách se znovu naplní receptorová část difúzní komory receptorovou kapalinou, zkompletuje se s kožním preparátem a na povrch se přidá 0,025% roztok methylenové modři. Po půl hodině se kůže omyje přípravkem Texapon N70. Receptorová kapalina se analyzuje pomocí fotometru při vlnové délce 661 nm. Koncentrace methylenové modři se stanoví pomocí kalibrační křivky [40].

4.5 Testovaná látka

4.5.1 Příprava

Testovaná látka je entitou, jejíž penetrační či absorpční profil má být studován. V ideálním případě lze látku označit radioaktivním zářičem. Látka je ve většině případů testována jako roztok, v některých případech jako suspenze, ale může být aplikována látka i v pevném skupenství. Je tedy vždy nutné vycházet z rozpustnosti testované látky již při přípravě roztoků. Za normálních okolností se používá rozsah více než jedné koncentrace testované látky, která představuje reálnou či potenciální expozici na člověka či jiný cílový organismus.

4.5.2 Rozpouštědlo

Při experimentu by se mělo volit vhodné rozpouštědlo dle scénáře expozice [16] nebo tak, aby nepůsobilo jako akcelerant kožní penetrace. Mezi akceleranty kožní penetrace patří látky, které interagují se strukturami kůže, což může mít za následek několik různých efektů: rozrušení organizované struktury lipidů v intercelulárních prostorech kůže, zejména ve vrstvě *stratum corneum*, dochází ke zvýšení fluidity a lepší propustnosti. Interakce s intracelulárními proteiny, především s keratinem, který zbobtná a stane se lépe propustný pro polární látky. Dále

jako urychlovače kožní penetrace slouží tzv. keratoplastika, což jsou látky používané k rozvolnění ztvrdlé a zrohovatělé kůže a látky podporující lokální prokrvení [41].

4.5.3 Aplikace na kožní preparát

Po zkompletování difúzního systému a jeho vytemperování se dává přesné množství testované látky, které by mělo simulovat expozici v reálném prostředí. Konečné dávky, se kterými se obvykle setkáváme, jsou v řádech 1-5 mg.cm⁻² pro pevné chemikálie a 10 µl.cm⁻² pro kapaliny. Množství by mělo být odůvodněno podmínkami studie [16].

4.5.4 Vliv koncentrace na rychlost penetrace

Práce autorů Zorin a kol., se zabývá vlivem koncentrace sledované látky na rychlost penetrace. V experimentu byla použita koncentrační sada roztoků od 1% roztoku nikotinu až po 100% nikotin. Výsledkem bylo, že nejvyššího toku dosáhl 50% roztok nikotinu. Naopak nejvyšší použitá koncentrace dosáhla téměř stejného toku jako 1% roztok [42]. Proto je vhodné a žádoucí testovat každou látku v řadě několika různých koncentrací [16].

4.5.5 Vliv velikosti částic na penetrační schopnost

Tým autorů Wu a kol., podrobili testu dermální penetrace nanočástice oxidu titaničitého (velikost částic byla 4 nm a 60 nm). Experimentálně bylo zjištěno, že velikost částic má vliv na rychlost penetrovat kůži sledovanou látkou. Konkrétně bylo zjištěno, že částice byly schopny penetrovat ve významném množství jen do vrstvy *stratum corneum*, permeace byla zanedbatelná, i když bylo v receptorové kapalině nalezeno stopové množství sledované látky [43].

4.6 Fyzikální podmínky experimentu

4.6.1 Teplota a vlhkost

Pasivní difúze je přímo ovlivněna teplotou. Obsah difúzní komory a kožní preparát by měly být udržovány při konstantní teplotě blízké normální lidské teplotě 32 ± 1 °C. Vlhkost (relativní vlhkost) by se měla udržovat mezi 30 % až 70 % [16].

4.6.2 Vliv teploty na rychlost penetrace

Kůži můžeme považovat za propustnou membránu, která se bude řídit Fickovými zákony, to znamená, že její propustnost bude ovlivněna teplotou. V experimentální studii bylo zjištěno, že se stoupající teplotou kožního preparátu a receptorové kapaliny se zvyšuje propustnost kůže, resp. difúzní koeficient [44].

4.7 Experiment

4.7.1 Doba trvání expozice

Kožní preparát může být vystaven testované látce buď po celou dobu trvání experimentu, nebo po kratší dobu, tzn. pro napodobení specifického typu expozice. Samotný experiment od expozice do odstranění testované látky by neměl překročit 24 hodin, jelikož se může začít měnit integrita kůže. Pro testované látky, které difundují rychle, můžeme čas experimentu zkrátit. Naopak u látek, které difundují pomalu, může být vyžadován delší čas [16].

4.7.2 Vzorkování

Vzorkování receptorové kapaliny se volí v takovém intervalu, který dovolí grafickou prezentaci penetračního profilu testované látky. Je nutné odebrat objem receptorové kapaliny vždy nahradit stejným objemem čerstvé, pokud možno vytemperované, receptorové kapaliny [16]. Dalším kritériem je dodržení tzv. „Sink condition“. Jedná se o stav, kdy kožní absorpce není ovlivněna rozpustností sledované látky. Resp. aby bylo zaručeno, že rozpustnost látky nebude ovlivňovat absorpční profil, nesmí být v receptorové kapalině koncentrace vyšší než 10 %. Někdy může být požadována větší flexibilita experimentu (pro látky s nízkou rozpustností), proto „sink condition“ může přesáhnout hranici 30 % [45].

4.8 Koncové procedury

4.8.1 Vzorkování po ukončení experimentu

Pro výpočet záchytu (znovuzískání resp. „recovery“) testované látky je nutné po ukončení experimentu kvantitativně převést zbytek receptorové kapaliny do vzorkovnice, omýt kožní preparát od zbytku testované látky, odebrat vzorky „strippů“ z kožního preparátu nebo provést extrakci testované látky z kožního preparátu. Dále se provede kvantitativní vymytí donorové a receptorové komory [16].

4.8.2 Odebírání strippů z kožního preparátu

Odebírání tzv. kožních strippů se provádí pomocí adhezivní pásky, která se přiloží na kožní preparát a strhne se, přitom na ni zůstane část svrchní vrstvy kůže. V praxi se většinou provádí 20 až 30 stržení. Kousky pásky se vzorky svrchní vrstvy kůže se dále vhodnou technikou extrahují a po analýze nám poskytují výsledky poukazující na penetraci [46].

4.8.3 Analýza vzorků z experimentu

Volba vhodné analytické metody záleží spíše na prostředcích laboratoře provádějící experiment a na povaze studované látky.

V praxi se setkáváme výhradně s metodami instrumentální analýzy. Ve velké míře se používá vysokotlaká kapalinová chromatografie [47,42,24], multi-dimenzionální plynová chromatografie [48] a metoda radioaktivního značení látek [49].

5 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

5.1 Matematické vyhodnocení výsledků

K interpretaci získaných dat a matematickému popisu procesu dermální absorpce je nejčastěji používáno několik veličin [8].

5.1.1 Rozdělovací koeficient (1)

$$K_m = \frac{C_{\text{penetrant v SC}}}{C_{\text{penetrant v DF}}} \quad (1)$$

Kde $C_{\text{penetrant}}$ [mol. dm⁻³] představuje rovnovážné koncentrace penetrující látky v donorové fázi a ve *stratum corneum* [8].

Rozdělovací koeficient se dá dále matematicky vyjádřit rovnicí (2):

$$K_m = \frac{K_p \cdot d}{D_m} \quad (2)$$

Kde d představuje difuzní dráhu, K_p [cm. h⁻¹] koeficient permeability a D_m [cm². h⁻¹] zdánlivý difúzní koeficient [47]. Rozdělovací koeficient K_m lze v praxi aproximovat hodnotou rozdělovacího koeficientu K_{ow} [8].

5.1.2 Koeficient permeability (3)

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C_d} \quad (3)$$

Kde J_{ss} [μg. cm⁻². h⁻¹] představuje tok v ustáleném stavu a C_d [mol. dm⁻³] je koncentrace penetrantu v aplikované dávce [47].

Koeficient permeability lze taktéž vyjádřit rovnicí (4):

$$K_p = \frac{K_m \cdot D}{l} \quad (4)$$

Kde K_m je rozdělovací koeficient, D [cm². h⁻¹] je difúzní koeficient a l [cm] představuje délku difúzní dráhy [28].

5.1.3 Tok (Flux)

První Fickův zákon (5):

$$J_s = K_p \cdot \Delta C_s \quad (5)$$

Kde J_s [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$] představuje tok penetrující látky, K_p [$\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$] koeficient permeability a ΔC_s [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] je rozdíl koncentrací penetrující látky [50].

Lze vyjádřit první Fickův zákon rovnicí (6):

$$J = -D \frac{\delta C}{\delta x} \quad (6)$$

Kde J [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$] představuje tok, δC [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] je změna molární koncentrace v závislosti na rozdílu polohy dvou blízkých míst, rozdíl poloh zde představuje veličina δx , D [$\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] je difúzní koeficient.

Druhý Fickův zákon (7):

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C}{\delta^2 x} \quad (7)$$

Z rovnice lze vyjádřit tok v ustáleném stavu, po úpravě výrazu dostaneme (8):

$$J_{ss} = \frac{D \cdot (C_1 - C_2)}{l} \quad (8)$$

Kde J_{ss} [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$] představuje tok v ustáleném stavu, D [$\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] difúzní koeficient, C [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] je koncentrace, kde $C_1 > C_2$ a l je délka difúzní dráhy, resp. tloušťka kůže [8].

5.1.4 Kumulativní množství (9)

$$\frac{\delta Q}{\delta t} = K_p \cdot (C_D - C_R) \quad (9)$$

Rovnici lze upravit do tvaru:

$$Q = K_p \cdot (C_D - C_R) \cdot t \quad (10)$$

Kde Q [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$] je kumulativní množství, K_p [$\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$] koeficient permeability, C [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] koncentrace penetrující látky (D – v donorové části, R – receptorové části) a t [h] značí čas [42].

Dle publikace autora Higuchi [51], lze kumulativní množství také definovat jako (11):

$$\frac{\delta Q}{\delta t} = \frac{D \cdot C_a}{h} \quad (11)$$

Tento vztah koresponduje s Fickovými zákony a po úpravě vztahu a substituci za h (resp. za veličinu l , která představuje délku difúzní dráhy) dostaneme výraz (12):

$$Q = \sqrt{D \cdot t \cdot (2A - C_a) \cdot C_a} \quad (12)$$

Za předpokladu, že tok je směrnicí kumulativního množství penetrantu přes jednotku povrchu kůže v závislosti na okamžitém čase, můžeme vztah zjednodušit na rovnici (13):

$$Q = \sqrt{[(2C_D - C_R) \cdot D \cdot t \cdot C_R]} \quad (13)$$

Kde Q [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$] je kumulativní množství, D [$\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] difúzní koeficient, t [h] čas a C [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] koncentrace penetrující látky (D – koncentrace v donorové části, R – koncentrace v receptorové části) [51].

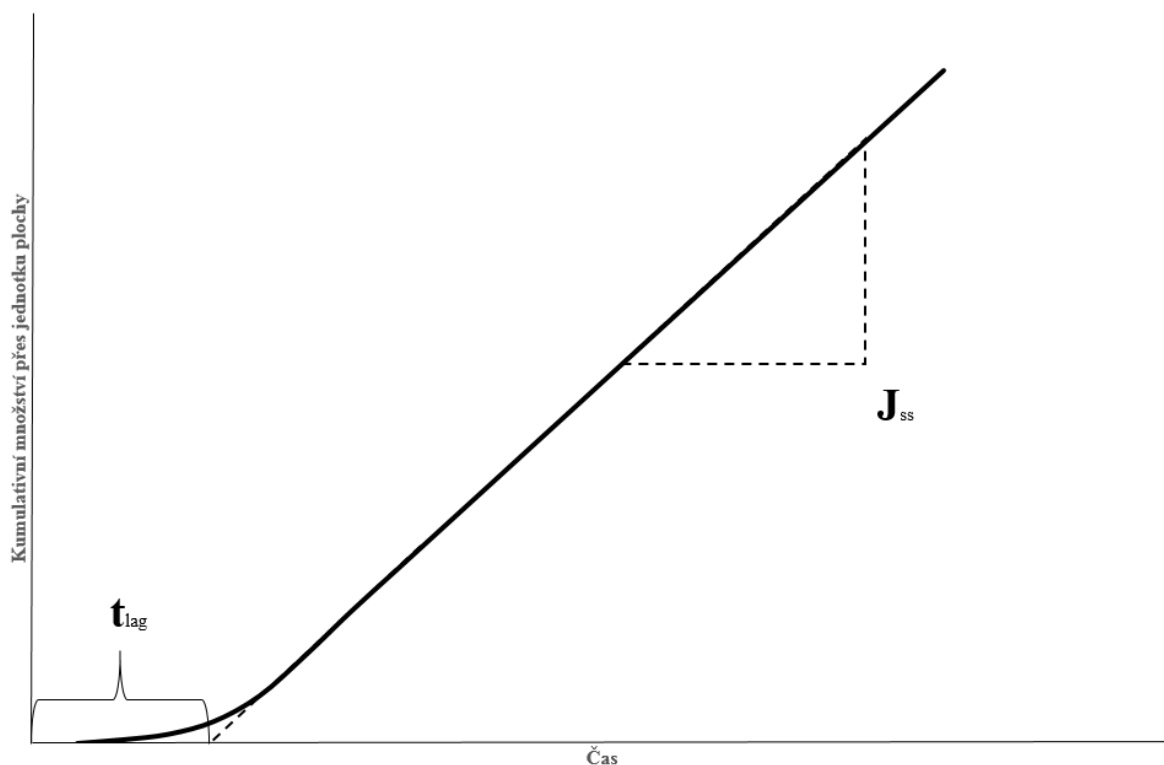
5.1.5 Časové zpoždění (14)

$$t_{lag} = \frac{l^2}{6D} \quad (14)$$

Kde t_{lag} [h] je časová prodleva před stavem ustáleného toku (viz bod 5.1.6), l [cm] délka difúzní dráhy a D [$\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] představuje difúzní koeficient [47].

5.1.6 Kumulativní množství v závislosti na čase

Graf 1 Kumulativní množství přes jednotku plochy v závislosti na čase [8]



Křivka grafu 1 znázorňuje průběh absorpce v čase. Prodloužení lineární části této křivky k ose x a její protětí dává veličinu t_{lag} tzv. časové zpoždění a směrnici udává veličina J_{ss} představující tok za ustáleného stavu. Časové zpoždění vyjadřuje čas potřebný k uvolnění látky z donorové fáze, pro průchod jednotlivými vrstvami kůže a difúzi látky do receptorové fáze. Čas potřebný k penetraci látky přes kožní preparát, aby bylo dosaženo 95 % její hodnoty v ustáleném stavu, je přibližně roven 2,3násobku času zpoždění. K dosažení 99 % hodnoty toku za ustáleného stavu je přibližně potřeba 3,2násobek doby času zpoždění. Z těchto důvodů je doporučována doba trvání experimentu delší než 2,7násobek doby času zpoždění [8].

6 LEGISLATIVA A VYUŽITÍ EXPERIMENTU V PRAXI

6.1 Cíl experimentu

Chemické látky na pracovišti, či v jiném prostředí, přichází do styku s kůží a mohou být absorbovány. Stanovení rozsahu dermální absorpce je klíčovým krokem v posuzování rizika chemických látek. Kožní absorpci může ovlivnit mnoho faktorů, jako je doba expozice, dávka a osud chemické látky v kůži [21].

Další cíle zavádění experimentu mají odůvodnění v koncepci 3R, integrované v aktuální legislativě. V podstatě jde o nahrazení *in vivo* experimentu OECD No. 427 – kožní absorpce na živých organismech [52].

6.2 Důvody zavádění experimentu

V poslední době prochází testování toxicity látek převratnými změnami. V EU bylo přijato nařízení REACH týkající se registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, jehož účelem je chránit lidské zdraví a životní prostředí, konkrétně se jedná o nařízení evropského parlamentu a rady ES č. 1907/2006. Dle odhadů Evropské agentury pro chemické látky, bude do roku 2018 zapotřebí na kompletní testování cca 30 tisíc již existujících chemických látek, okolo 9 milionů zvířat [53].

V roce 2014 byla vydána institucí EURL ECVAM publikace s kompletní strategií pro nahrazení, snížení počtu a zdokonalení postupů používání živých zvířat při hodnocení akutní systémové toxicity, které zahrnují i alternativní metody *in vitro*. Jedná se o experimenty, které využívají místo živých zvířat, relevantní biologické modely. Každopádně tento koncept vznikl již v roce 1959 [54]. Cílem vědeckých organizací a společností proto bylo a je stále hledat takové alternativní metody testování toxických a nežádoucích účinků chemických látek, pomocí kterých by úkol, zadaný politikou REACH a právními normami o kategorizaci chemických látek a přípravků, byl zvládnutelný a levnější [55].

6.3 Koncept 3R

Zkratka 3R představuje moderní toxikologické postupy, které zaštiťují body „replacement“ (nahrazení), „reduction“ (redukce) a „refinement“ (vylepšení) [55]. Tento koncept má základy v publikaci autorů Russel a Burch [56], kde navrhuje, aby v případě zvířat, používaných v experimentech, každý vyvinul úsilí pro jejich nahrazení za alternativní metodu, snížil jejich počty na minimum, zlepšil a zpřesnil experimenty tak, aby působily minimální bolest a stres. Publikace také uvádí informaci, že koncept 3R může zlepšit kvalitu

vědeckého zázemí a znalostí. Vhodně navržené experimenty, které minimalizují variabilitu výstupních dat, mohou poskytovat optimální podmínky pro výzkum a zlepšit tak životní podmínky laboratorních zvířat.

6.3.1 Nahrazení

Dlouho přijatý postoj akademických a výzkumných organizací je hledat nové metody a techniky v rámci přirozeného vývoje výzkumu. Záměrně se hledají alternativní metody k široké škále experimentů uplatňovaných na laboratorních zvířatech [57].

V publikaci autorů Russel a Burch uznávají autoři, že testy na zvířatech nepřinášejí příliš přesná toxikologická data, která by se dala přenést na člověka, ale jedná se o odhad účinků testovaných látek [56].

6.3.2 Redukce

V rámci konceptu 3R jsou tradiční *in vivo* metody upravovány zejména tak, aby se redukoval počet testovaných zvířat a snížilo se jejich utrpení [53].

6.3.3 Vylepšení

Při definování experimentů, které způsobují minimální bolest a utrpení zvířat, identifikovali autoři Russell a Burch dvě odlišné oblasti zájmu. Zdroj bolesti a stresu způsobené v důsledku životních podmínek a zdroj bolesti a stresu způsobeny jako přímý důsledek experimentu [56].

V rámci konceptu 3R byly provedeny velmi značné změny v oblastech zamezení klinického onemocnění zvířat, ustájení zvířat v pečlivě řízeném prostředí se standardizovanými podmínkami (podestýlka a strava). To prakticky eliminovalo anatomické nedostatky způsobené nevhodným chovem a problémy jako je hypovitaminóza vitamínu C způsobená neoptimální stravou. Tento krok měl také za následek snížení variability výstupních dat experimentů prováděných na zvířatech [58].

6.4 Legislativa

6.4.1 Všeobecná legislativa

Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1907/2006, které pojednává o podmínkách registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek a o zřízení evropské agentury pro chemické látky (ECHA), se odkazuje v rámcich toxikologických studií na směrnici rady 86/609/EHS, která pojednává o ochraně zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely. Směrnice rady přímo definuje pojmy:

Zvířata

Všichni živí obratlovci kromě člověka, včetně larválních forem schopných samostatného života nebo larválních forem schopných reprodukce, nikoli však plody nebo embrya.

Pokusná zvířata

Zvířata, která jsou nebo mají být používána k pokusům.

Chovaná zvířata

Zvířata, která byla odchována v úředně povolených nebo registrovaných zařízeních výlučně pro pokusné účely.

Pokus

Každé použití zvířete k pokusným nebo jiným vědeckým účelům, které může vést k bolesti, utrpení, strachu nebo trvalým poškozením včetně zákroků, které mají nebo mohou vést k tomu, aby se zvíře takovým způsobem narodilo. Nepatří sem však metody usmrcování nebo značkování zvířete, které jsou moderní praxí přijímány jako nejméně bolestivé (tj. bezbolestné). Pokus začíná, když je zvíře poprvé připravováno k testování a končí, když v souvislosti s tímto pokusem není už třeba konat další pozorování.

Dále směrnice zřetelně uvádí: „Pokus nesmí být proveden, je-li pro dosažení žádaného výsledku k dispozici vědecky vyhovující, zastupitelná a proveditelná alternativa, při které nemusí být použito zvíře“ [59].

6.4.2 Legislativa kosmetického průmyslu

V roce 1992 byl v ČR přijat zákon o ochraně zvířat proti týrání, který byl v roce 2004 novelizován a hovoří o zákazu zkoušek kosmetických přípravků a ingrediencí na zvířatech [60].

V roce 2003 vyšel sedmý dodatek kosmetické směrnice, který zakazuje testování finálních výrobků na zvířatech od 11. 9. 2004. Dále zakazuje uvádět na trh výrobky, jejichž ingredience byly testované na zvířatech poté, co existovala validovaná alternativní metoda. Nakonec sedmý dodatek kosmetické směrnice uveřejňuje konečné termíny (11. 3. 2009 pro většinu testů) pro ukončení testů ingrediencí na zvířatech [61].

6.5 Další alternativní experimenty

6.5.1 *In silico* experimenty

Tradiční i rychlé alternativní laboratorní testy umožnily vytvořit dostatečně rozsáhlé soubory dat dobré kvality, které posloužily a slouží k vývoji a validaci predikčních toxikologických výpočetních modelů. Takovýchto modelů pro odhad toxicity výpočtem (*in silico* testy) existuje řada. Některé mají již i praktické využití, další jsou ve vývoji a ve stavu studií. Lze je shrnout mezi následující typy:

- modely vytvořené a analyzované technikami (QSAR),
- kinetické fyziologické simulační modely (PBSM),
- modely založené na biologické podobnosti a allometrických rovnicích,
- expertní systémy založené na souborech znalostí a pravidel,
- modely vytvořené technikami molekulové grafiky,
- kombinace různých modelů s umělou neuronovou sítí (ANN) [55].

6.5.2 *In vitro* experimenty

Progresivnějším přístupem, než je pouhá úprava postupů testů *in vivo* dle koncepce 3R, je úplná náhrada testovacích organismů jejich *in vitro* alternativami. Latinský termín *in vitro* znamená „ve skle“. To lze volně definovat jako „alternativu bez použití celých zvířat“. Metoda je tedy založena pouze na buněčných a tkáňových systémech nebo izolovaných orgánech. Metody *in vitro* využitelné pro stanovení akutní systémové toxicity spadají do tří obsáhlých kategorií:

- testy cytotoxicity (např. 3T3 NRU),
- orgánově-specifické testy (např. CFU-GM),
- toxikokinetické metody (např. dermální penetrace) [53].

6.6 Využití experimentu

6.6.1 Farmacie

Ve farmaceutickém výzkumu se experiment dermální penetrace používá ke studiu chování léčiv a jejich akceleračtů penetrace aplikovaných transdermálně.

Aplikace léčiv perorální cestou v sobě skrývá některá úskalí. Mezi nejběžnější patří: nestandardní vstřebávání léčiv z trávicího traktu, dráždění sliznic trávicího traktu, metabolizace léčiva játry, před samotným účinkem léčiva (metabolická inaktivace), nemožnost ukončit převod léčiva do systémového oběhu. Další možností je parenterální aplikace, která vyžaduje pro provedení kvalifikovaný zdravotnický personál. Transdermální průchod je pro většinu léčiv poměrně obtížný. Koncem 70. let 20. století začal být tento problém zvládnutelný, vzhledem k nástupu poznatků z oblasti akceleračtů penetrace [41].

V publikaci se tým autorů Santoyo, Arellano, Ygartua, Martin [62] zabývá urychlením transdermální aplikace léčiva piroxicamu (NSAID) metodou *in vitro*.

V moderní medicíně, či ve farmaceutickém průmyslu a výzkumu, nemají chemické akceleračty potenciál. Jsou postupně nahrazovány metodami pasivní či fyzikální akcelerace jako jsou např. „Needle-free injection“ nebo „skin abrasion“ [63].

6.6.2 Toxikologie

In vitro experiment dermální penetrace patří do skupiny alternativních testů toxikokinetiky [53]. Experiment se využívá pro hodnocení rizik expozice pro člověka na pracovišti. Sledováno je hlavně množství přijaté organismem, které je důležité pro studium systémové toxicity [64,65].

Autoři Adami a kol. se ve své publikaci [48] zabývají problematikou profesní expozice metodou *in vitro*. Subjektem byli operátoři, kteří byli exponováni benzínem, který obsahoval směs benzenu, toluenu, *o*-xylenu a *p*-xylenu. Výsledky svého experimentu porovnali s literárními daty publikací [66, 67, 68, 69, 70, 71]. Výsledky v některých bodech korelovaly. Nejvíce se shodovaly výsledky pro směs xylenu s daty publikace [68].

6.6.3 Kosmetika

Zkoušky kosmetických přípravků a ingrediencí jsou na zvířatech legislativou zakázány (viz bod 6.4.2), mohou se tedy provádět pouze metodami *in vitro*. V publikaci [72], se tým autorů Brain a kol. zabývá zdravotními riziky, přítomností diethanolaminu, který je zastoupen jako minoritní složka alkanolamidických ingrediencí v kosmetických přípravcích. Samotný experiment byl proveden *in vitro* na lidské kůži, zároveň také porovnává rozdíly při použití čerstvé kůže a skladované kůže při teplotě -20 °C po dobu jednoho týdne. Výsledná data z experimentu korelovala s literárními daty Sun a kol. [73]. Bylo tak zjištěno, že diethanolamin není schopný pronikat do systémového oběhu v nebezpečném množství tak, aby poškodil zdraví organismu [72].

6.6.4 Agrochemie

V sektoru zemědělství se hojně aplikují pesticidy a hnojiva. Produkce agrochemie zastupuje velký podíl ve výrobě chemikálií. Jelikož si jsou výrobci vědomi zdravotních rizik, především u pesticidů (převážně kumulativní jedy), stanovují se dermální expoziční limity. Někteří producenti agrochemie využívají metodu *in vitro* [74].

Autoři van de Sandt a kol. [75] sledovali penetrační profil pesticidu propoxur metodou *in vitro*. K provedení experimentu použili kožní preparáty vytvořené z lidské a potkaní kůže. Získané výsledky porovnali mezi sebou a s daty získanými *in vivo*. Při pohledu na výsledná data se dá říci, že *in vitro* a *in vivo* výsledky byly v případě člověka stejné. V případě potkanů jsou výsledky až 8násobně rozdílné. Při porovnání pouze *in vitro* výsledků (porovnání člověk a potkan) lze konstatovat, že jsou téměř stejné.

7 DISKUZE

Tato kapitola reviduje nejdůležitější faktory a nastiňuje řešení problematiky dermální absorpce, které vychází z experimentálních dat a faktů. Je třeba si uvědomit, že experiment začíná expozičním scénářem, který ovlivní výběr materiálu a metodiky.

7.1 Volba materiálu

7.1.1 Difúzní komory

Běžně se k experimentu využívají horizontální statické komory dle Franze, s rozdílnými objemy receptorové a donorové části [42,48]. V menší míře se používají i průtokové komory [76]. U statických komor musí být zajištěno stálé míchání, odebrání vzorků receptorové kapaliny ve vhodně zvoleném časovém intervalu a její nahrazování za čerstvou receptorovou kapalinu (viz bod 7.2.4) tak, aby se udržel tzv. „sink condition“. Další úskalí představují vzduchové bubliny, které se mohou dotýkat kožního preparátu a narušovat resorpci sledované látky na vzniklém fázovém rozhraní kůže-kapalina [17].

7.1.2 Zdroje kůže

Lidská kůže se jeví jako nejvhodnější volba pro predikci dermální absorpce u člověka. Použitím lidské kůže dosáhneme minimalizace rozdílů ve výsledcích (tabulka 3) v důsledku rozdílů vlastností propustnosti způsobené různou tloušťkou *stratum corneum* a různou hustotou folikul.

Kůže ze zvířete nemůže plnohodnotně v experimentech nahradit kůži lidskou, od které se liší několika rozdíly. Většina zvířat má hustou srst a tloušťka *stratum corneum* je často tenčí než v lidské kůži. Vhodnou volbou je použití kůže ze zvířete s minimem srsti či bez srsti. Doporučená volba kůže pro extrakci kožních preparátů je prasečí kůže, která je fyziologicky velmi podobná lidské kůži, kromě toho, ale existují speciální kmeny bezsrstých zvířat. Kožní preparáty ze zvířecích kůží mohou být použity pro vyhodnocení relativní permeability látek pro porovnání s *in vivo* výsledky (viz bod 7.4) [17].

Tabulka 3 Porovnání kožních preparátů zhotovených z lidské a prasečí kůže [28]

Látka			Prase		Člověk			
Název	MW	Log K_{ow}	Preparát	Kp (cm.h ⁻¹)	Preparát	Kp (cm.h ⁻¹)	FOD	Reference
Ethylnikotinát	151,2	1,32	ST	4,40E-02	ST	3,90E-02	1,10	[77]
Nikotin	162,0	1,80	ST	1,11E-02	ST	1,02E-02	1,10	[78]
Salicylová kys.	138,0	1,80	ST	2,57E-02	ST	2,63E-02	1,00	[79]
Tridecan	184,4	6,73	ST	6,98E-05	ST	6,70E-05	1,00	[80]
Voda	18,0	-1,38	ST	1,80E-03	ST	1,58E-03	1,10	[81]

K zjištění odlišnosti výsledků (tabulka 3) je použit tzv. factor of difference (FOD). Čím více se hodnota blíží číslu 1, tím více jsou porovnávané výsledky stejné.

7.1.3 Modely kůže

Modely kůže, resp. RHE, není doporučeno používat jako náhradu za kožní preparáty v experimentu dermální absorpce z důvodů biochemické nedokonalosti. Konkrétně mají nižší koncentraci volných mastných kyselin a ceramidových lamel ve vrstvě *epidermis* a mohou tak významně ovlivňovat výsledná data experimentu [24].

7.1.4 Receptorová kapalina

Hlavním předpokladem při výběru receptorové kapaliny je její šetrnost ke kožnímu preparátu. Nesmí ho jakkoliv poškozovat, nesmí působit jako akcelerační dermální absorpce a musí podporovat úplné rozpuštění dávky penetrantu tak, aby neovlivňovala absorpční profil.

Složení receptorové kapaliny se může lišit dle povahy látky, jejíž absorpční profil má být studován. V laboratorní praxi se nejvíce používá fyziologický roztok, který se ve většině případů pufruje na pH = 7,4. Takto připravená receptorová kapalina má stejnou osmolaritu a pH jako krevní plazma, napodobuje tak tělní tekutinu v krevním řečišti. Bohužel takto jednoduchá kompozice má své limity použitelnosti v experimentu.

Vhodná kompozice receptorové kapaliny by měla být zvolena dle charakteru sledované látky a rozhodujícími faktory jsou nejčastěji rozdělovací koeficient oktanol-voda a rozpustnost.

Pro hydrofilní látky je dostačující fyziologický roztok, který se ve většině případů pufruje na konstantní pH = 7,4 pomocí fosfátového pufru. Taková kompozice je plně dostačující pro potřeby studia absorpčního profilu.

Pro lipofilní látky je pufrovaný fyziologický roztok nedostačující. Lipofilní látky se v ní rozpouštějí jen velmi málo či nikoliv, to znamená, že nedochází k žádné resorpci. V laboratorní praxi se často používají kompozice s přídavkem ethanolu, polyethylenglykolu (doporučený je

s MW = 20), glycerolformalu, Volpo 20 nebo BSA (tabulka 4) [17]. Ethanol či polyethylenglykol mohou působit jako akcelerant dermální penetrace. Obecně alkoholy působí jako akceleranty, které delipidizují kožní bariéru. Největší účinnost akcelerace je dosažena v intervalu koncentrací od 40 % do 60 % [41].

Při experimentu, kde sledujeme i metabolismus penetrantu, musíme zajistit životaschopnost kožního preparátu po dobu experimentu, nejméně však 24 hodin. Je-li experiment delší, musí se do receptorové kapaliny přidat tkáňové kultivační médium, doporučena jsou i antibiotika [17].

Tabulka 4 Nejběžnější složení receptorových kapalin

Receptorová kap.							
číslo	Látka	% hm.	Látka	% hm.	Látka	pH	Reference
1	NaCl	0,9	BSA	5	Fosfátový pufr	7,4	[48]
2	NaCl	0,9			Fosfátový pufr	7,4	[72]
3	NaCl	0,9	BSA	5	Fosfátový pufr	7,4	[31]
4	NaCl	0,9			Fosfátový pufr	7,4	[43]
5	Ethanol	25			Fosfátový pufr	7,4	[81]
6	NaCl	0,9			Fosfátový pufr	7,4	[82]

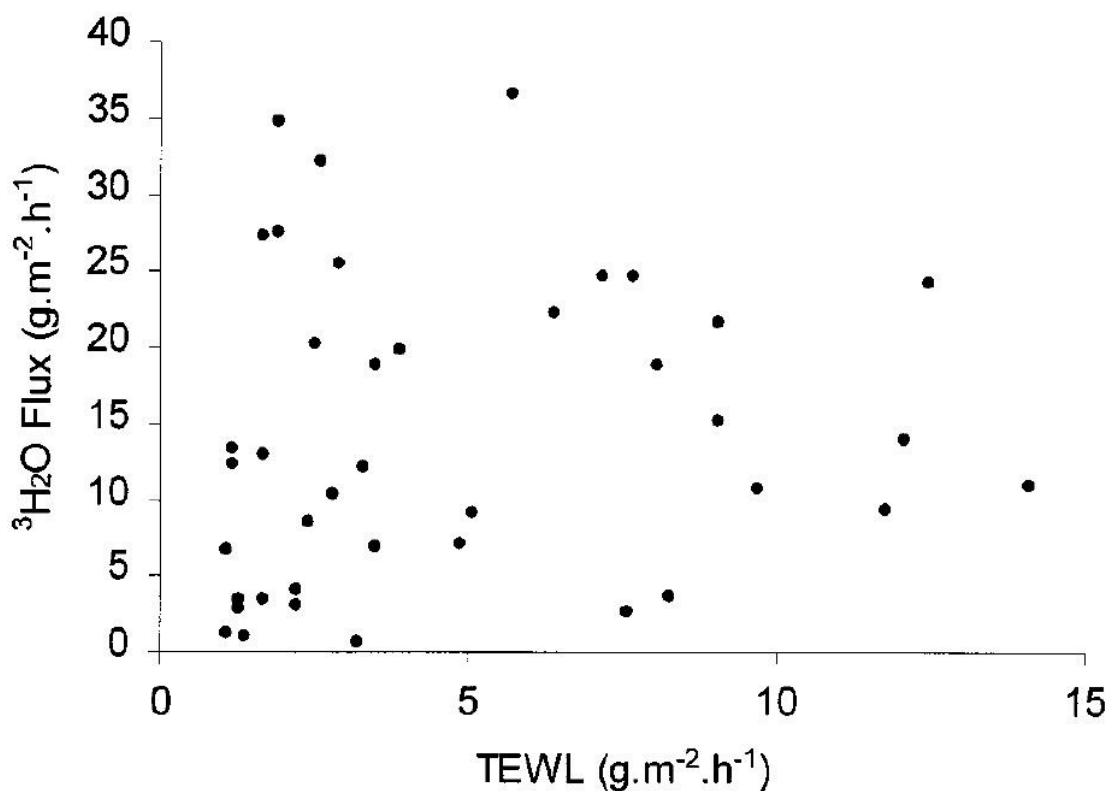
7.2 Volba metodiky experimentu

7.2.1 Kontrola integrity kožních preparátů

V laboratorní praxi se nejvíce používají tři instrumentální metody měření integrity kůže či kožních preparátů: transepidermální ztráta vody (TEWL), transepitelální elektrická resistence (TEER) a tok tritiové vody (TWF). Některé metody mají své limity použití nebo byla zpochybněna jejich spolehlivost poskytovat validní data.

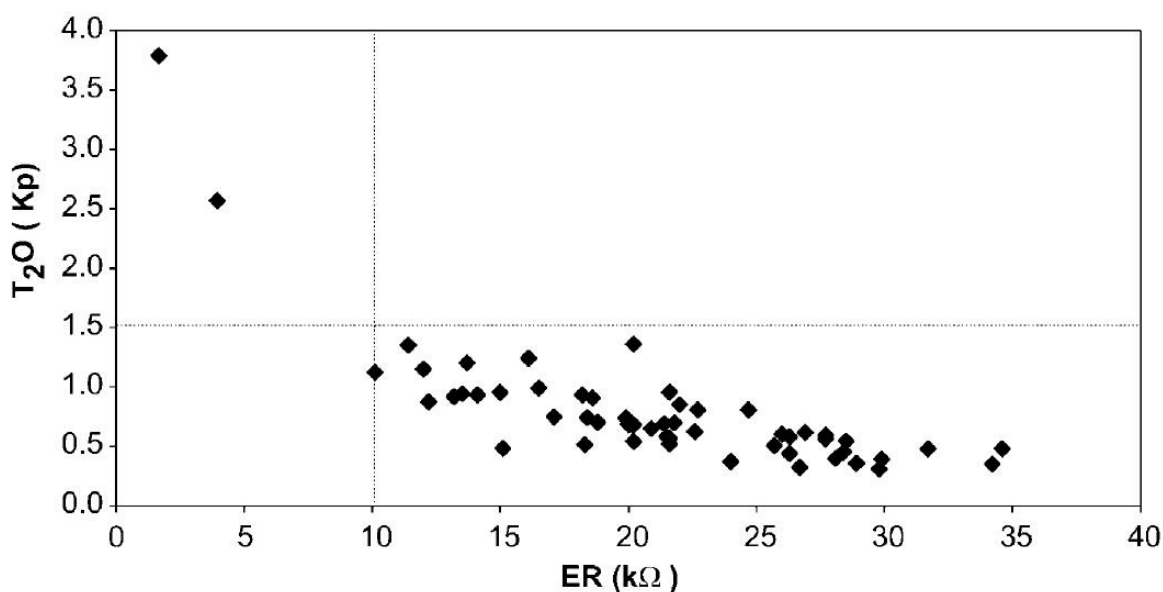
V roce 2002 vyšel článek [34], který zpochybňuje metodu TEWL. Účelem studie bylo zjistit vztah mezi ztrátou transepidermální vody a propustností kůže pro tritiovanou vodu *in vitro*. Dle naměřených dat lze usuzovat, že transepidermální ztráta vody není bezpodmínečně měřítko integrity kožního preparátu (Graf 2).

Graf 2 Tok tritiové vody v závislosti na transepidermální ztrátě vody [34]



Studie autorů Davies, Ward a Heylings [83] poukazuje na důležitost kontroly integrity kožního preparátu před samotným experimentem. Zachování celistvosti kožního preparátu je nezbytnou součástí metody *in vitro*, jak je popsáno v OECD No. 428. Z hlediska posouzení metody toku tritiové vody a transepiteliální elektrické resistance lze celkově říci, že pro kožní preparáty z kůže člověka, krysy, prasete, myši, králíků a morčat dostaneme inverzní vztah s odpovídající hodnotou koeficientu permeability. Čím vyšší hodnota koeficientu permeability, tím nižší hodnota transepiteliální elektrické resistance (Graf 3).

Graf 3 Koeficient permeability tritiové vody v závislosti na transepiteliální elektrické resistenci [81]



7.2.2 Podmínky experimentu

Experiment by neměl trvat déle než 24 hodin [16]. Některé látky, však potřebují delší dobu, aby pronikly do receptorové kapaliny či do struktury kožního preparátu. Již při krátkém čase se ovlivní tok sledované látky kožním preparátem, kvůli jeho velké hydrataci. Proto je vhodné sledovat integritu kožního preparátu pomocí TEER v průběhu experimentu. Zde je velikou výhodou neinvazivnost metody měření integrity kožního preparátu pomocí TEER.

7.2.3 Vzorkování a koncové procedury

Interval vzorkování by měl dovolit grafickou prezentaci ve formě grafu. Navíc musí interval odběru být v takové frekvenci, aby se zaručil stav „sink condition“. V některých publikacích autoři volí odběr vzorku receptorové kapaliny v intervalu 30, 60, 120, 240 a 480 minut [48], nebo 60, 120, 240 a 480 minut [31]. Z popisu experimentů je vidět, že interval je značně variabilní dle uvážení vedoucího experimentu. Některé grafické prezentace se zdají být nesrozumitelné kvůli minimu odběrů vzorků receptorové kapaliny a u většiny případů není vidět doba zdržení sledované látky.

7.3 Srovnání různých výsledků a publikací

V roce 1975 byla vydána publikace autora Franz [84], která porovnává výsledky *in vitro* s daty z *in vivo* experimentů dermální absorpce (viz Tabulka 5). Hlavním cílem publikace je zjistit, do jaké míry se dají data získaná experimenty *in vitro* extrapolovat na lidský organismus.

Tabulka 5 Porovnání výsledků experimentu dermální absorpce *in vivo* a *in vitro* [84]

Látka	Výsledky		
	<i>In vivo</i> [%]	<i>In vitro</i> [%]	FOD
Hypurová kyselina	0,2 ± 0,1	1,2	0,2
Nikotinová kyselina	0,3 ± 0,1	3,3	0,1
Thiomočovina	0,9 ± 0,2	3,4	0,3
Chloramfenikol	2,0 ± 2,5	2,9	0,7
Fenol	4,4 ± 2,4	10,9	0,4
Močovina	6,0 ± 1,9	11,1	0,5
Nikotinamid	11,1 ± 6,2	28,8	0,4
Acetylsalicylová kys.	21,8 ± 3,1	40,5	0,5
Salicylová kyselina	22,8 ± 13,2	12,0	0,5
Benzoová kyselina	42,6 ± 16,5	44,9	0,9
Kofein	47,6 ± 21,0	9,0	0,2
Dinitrochlorbenzen	53,1 ± 12,4	27,5	0,5

Výsledky (tabulka 5) jsou vyjádřeny jako prošlé procento z aplikované dávky. K zjištění odlišnosti výsledků, je použit tzv. factor of difference (FOD). Čím více se hodnota blíží číslu 1, tím více jsou porovnávané výsledky stejné.

Tabulka 6 Porovnání výsledků experimentu dermální absorpce *in vivo* a *in vitro* kyseliny benzoové a kofeinu [31, 84]

Pracoviště		Dif. komora	Plocha [cm ²]	Kožený preparát	Dislokace	[mm]	Kyselina benzoová			Kofein		
Název	Typ						Pohlaví a věk	In vivo [%]	In vitro [%]	FOD	In vivo [%]	In vitro [%]
University of Newcastle	Průtočná	0,64	Žena (20-59)	Prsa	0,5	42,6	63	0,7	47,6	19,1	0,4	
Istituto di Medicina del Lavoro	Průtočná	0,95	Muž (67-90)	Noha	0,7-0,9	42,6	51,5	0,8	47,6	10,9	0,2	
Universita di Trieste	Statická	3,14	Muž, Žena (67-89)	Břicho	0,8-1,8	42,6	83,3	0,5	47,6	11,3	0,2	
TNO Nutrition and Food Research	Průtočná	0,64	Žena (20-69)	Břicho	0,7	42,6	86,8	0,5	47,6	34,9	0,7	
Institut Nat. de Recherche et de Sécurité	Statická	1,76	Potkan	---	---	42,6	89,8	0,5	47,6	53,7	0,9	
Imperial College London	Průtočná	0,32	Žena (29-50)	Břicho	0,9	42,6	42,7	1	47,6	21,7	0,5	
Health and Safety Laboratory	Průtočná	0,5	Žena (26-60)	Břicho	0,5-0,7	---	---	---	47,6	46,5	1	
University of Southern Denmark	Statická	2,12	Žena (16-68)	Prsa, Břicho	0,7-1,1	42,6	68,8	0,6	47,6	23,5	0,5	
University of Erlangen-Nuremberg	Statická	0,64	Muž, Žena (40-79)	Prsa, Noha	0,9	42,6	90,3	0,5	47,6	32,6	0,7	
Huntingdon Life Sciences Ltd.	Průtočná	0,64	Muž, Žena (40-72)	Břicho, Noha	0,3-0,4	42,6	77,8	0,5	47,6	20,1	0,4	

Dle dostupných literárních dat bylo provedeno srovnání výsledků experimentů dermální penetrace. Srovnány jsou výsledky získané metodou *in vitro* s daty získanými metodou *in vivo* (tabulka 6), výsledky jsou vyjádřeny jako prošlé procento z aplikované dávky [31,84].

Testování kys. benzoové a kofeinu metodou *in vivo* bylo provedeno na mužích. K zjištění odlišnosti výsledků, je použit tzv. factor of difference (FOD). Čím více se hodnota blíží číslu 1, tím více jsou porovnané výsledky stejné.

7.4 Shrnutí

V diskuzi byly rozebrány nejdůležitější faktory zásadně ovlivňující experiment. Již na začátku testování, např. při volbě materiálu, se určuje, za jakým účelem se experiment bude provádět a jaké látky se budou testovat (charakter látky, např. převládající lipofilita či hydrofilita). Následně se dle těchto parametrů musí specifikovat, jaký typ difúzní komory bude nejvhodnější použít. Dle těchto kritérií se musí také vybrat vhodný dárce kůže a připravit použitelný kožní preparát tak, aby nebyla ovlivněna správnost výsledků. Receptorová kapalina zastupuje roli krevní plazmy a musí být vhodná pro testovanou látku tak, aby nepůsobila jako bariéra dermální absorpce. Zároveň nesmí působit jako tzv. akcelerant, tedy jako látka zvyšující tok sledovaného penetrantu kožním preparátem.

Další obsáhlou problematikou se jeví kontrola integrity kožního preparátu. Za metodu, která poskytuje poměrně správné výsledky, lze považovat TWF. Bohužel se jedná o invazivní metodu, při níž se kožní preparát nereálně hydratuje, a tudíž je následující experiment ovlivněn. Další metodou kontroly integrity kožního preparátu je TEER. Jedná se o neinvazivní metodu poskytující poměrně spolehlivé výsledky. Nespornou výhodou je možnost měření integrity kožního preparátu před, během a po skončení experimentu.

Nezanedbatelným faktorem je zde volba fyzikálních podmínek. Teplota by neměla překročit hodnotu předepsanou OECD, která je 32 °C. Tuto teplotu by měla mít jak receptorová kapalina, tak kožní preparát na povrchu a povolená odchylka je cca ± 1 °C. Teplota by během experimentu měla být spíše konstantní bez odchylek, protože velmi ovlivňuje tok sledované látky kožním preparátem.

Frekvence odběrů vzorků receptorové kapaliny také ovlivňuje vývoj celého experimentu. Jestliže studujeme látku, která má nízkou rozpustnost v receptorové kapalině, musíme dle výpočtů zvolit optimální frekvenci odběrů vzorků tak, aby byla udržena „sink condition“, resp. aby rozpustnost v receptorové kapalině nepředstavovala bariéru na fázovém rozhraní kožní preparát a receptorová kapalina.

Před započítáním experimentu dermální absorpce je důležité určit, jaké účinky látky budeme sledovat. Má-li být předmětem studia dermální absorpce, schopnost látky vázat se v určitých vrstvách kůže, musíme použít správný kožní preparát a na konci experimentu provést stripping. Naopak při studiu schopnosti resorpce sledované látky do krevního řečiště je vhodné zvolit nejlépe se hodící kožní preparát (dle charakteru sledované látky). Po ukončení experimentu je vhodné provést koncové procedury, které poskytnou po analýze data pro zpracování tzv. recovery, za předpokladu, že nebyl použit vnitřní standard.

V literatuře se nejčastěji setkáme s výsledky v jednotkách toku ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) a permeačního koeficientu ($\text{cm}^2\cdot\text{t}^{-1}$). Časté je také vyjádření výsledku v procentech jako totální absorpce. Nejpřehlednějším způsobem, jak vyjádřit naměřená data je v jednotkách toku ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Dle jednotky si lze představit, jaké množství na jednotku plochy za čas je schopno resorbovat do vnitřního prostředí organismu.

Při dokonalém nastavení parametrů a výběru materiálu pro experiment dermální absorpce se dají získat správná a validní data, která se do značné míry, dají extrapolovat na člověka. Při srovnání výsledků některých prací (viz bod 7.4) můžeme dojít k závěru, že *in vitro* data jsou málo přesná, ale většina hodnot leží v intervalu (po započtení směrodatné odchylky) dat naměřených experimentálně *in vivo*.

8 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce s názvem „*In vitro* test kožní penetrace jako alternativní test toxicity“ řeší problematiku experimentu dle směrnice OECD No. 428.

Samotná metodika s volbou a přípravou materiálu je rozsáhle rozepsána. Dalším cílem bakalářské práce bylo seznámit čtenáře s variabilitou provedení experimentu, z čehož plyne možnost výběru materiálu a použití různých technik. Na druhou stranu z této možnosti plynou i některá úskalí, která nemusí být na první pohled zřetelná.

Hlavní kapitoly bakalářské práce detailně popisují problematiku složení a fungování kůže, mechanismů průniku chemických látek skrze kůži, metodiky experimentu, interpretace dat a zároveň jsou zmíněny důvody zavádění tohoto experimentu v souvislosti s legislativou.

V neposlední řadě jsou popsány faktory, zásadně ovlivňující výsledek experimentu. Tyto faktory jsou vzájemně porovnávány a diskutovány v kontextu experimentu.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HUGHES, J. *Velká obrázková encyklopedie*. Svojtka & Co., 1999. ISBN 80-7237-256-4
- [2] LICHNOVSKÝ, V., et al. *Základy histologie pro bakaláře*. Olomouc: Vydavatelství univerzity Palackého, 1997. ISBN 80-7067-699-x.
- [3] BORSKÁ, L., FIALA, Z., KOTINGOVÁ, L. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chemické listy* [online]. 2009, no. 103, p. 533–539. ISSN 1213-7103
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf
- [4] JELÍNEK, R., et al. *Histologie, embryologie* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2006, Dostupné z: <http://histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>
- [5] MADISON, Kathi C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2003, 121(2), 231-241 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x. ISSN 0022202x.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15303560>
- [6] HRABÁLEK, A., VÁVROVÁ, K. Role ceramidů v kůži. *Praktické lékárenství* [online]. 2006, p. 55–58. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/02/01.pdf> . ISSN 1803-5329.
- [7] REES, J. L., et al. What is the ‘true’ function of skin? *Experimental dermatology* [online]. 2002, vol. 11, no. 2, p. 159–187. ISSN 0906-6705. Dostupné z: <http://www-hsc.usc.edu/~cmchuong/2002ExpDermatol.pdf>
- [8] KOTINGOVÁ, L. *Kinetika vybraných látek při dermální expozici (Polycyklické aromatické uhlovodíky)*: Disertační práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, 2015. 156 p.
- [9] MERK, H. F., HEWITT, N. J., REISINGER, K., WIEGAND, C. Dermal xenobiotic metabolism: a comparison between native human skin, four in vitro skin test systems and a liver system. *Skin Pharmacol Physiol* [online]. 2014, vol. 27, no. 5, p. 263–275. DOI: 10.1159/000358272. ISSN 1660–5527.
- [10] ARENS, E. a H. ZHANG. The skin’s role in human thermoregulation and comfort. Thermal and Moisture Transport in Fibrous Materials, *Elsevier* [online], 2006, s. 560 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1533/9781845692261.3.560. ISBN 9781845690571. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845690571500168>

- [11] ŠTIKOVÁ, J. *Standardizovaná studie kožního průniku kofeinu z krémů s transkarbamem 12*: Rigorózní práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, 2011. 141p.
- [12] OTBERG, Nina, Heike RICHTER, Hans SCHAEFER, Ulrike BLUME-PEYTAVI, Wolfram STERRY a Jürgen LADEMANN. Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2004, 122(1), 14-19 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1046/j.0022-202X.2003.22110.x. ISSN 0022202x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15306291>
- [13] LADEMANN, J., H. RICHTER, U.F. SCHAEFER, U. BLUME-PEYTAVI, A. TEICHMANN, N. OTBERG a W. STERRY. Hair Follicles – A Long-Term Reservoir for Drug Delivery. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2006-7-1, 19(4), 232-236 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1159/000093119. ISSN 1660-5527. Dostupné z: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000093119>
- [14] LADEMANN, J., H. RICHTER, U. JACOBI, et al. Human percutaneous absorption of a direct hair dye comparing in vitro and in vivo results: Implications for safety assessment and animal testing. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, 46(6), 2214-2223 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.fct.2008.02.018. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691508001051>
- [15] KUROSUMI, Kazumasa, Susumu SHIBASAKI a Toshio ITO. *Cytology of the Secretion in Mammalian Sweat Glands* [online]. s. 253 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)62445-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769608624456>
- [16] SECTION 4: HEALTH EFFECTS TEST NO. 428: SKIN ABSORPTION: IN VITRO METHOD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. S.l.*: OECD Pub, 2004. ISBN 9789264071087.
- [17] SARTORELLI, P, H.R ANDERSEN, J ANGERER, et al. Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2000, 8(2), 133-152 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/S1382-6689(00)00035-1. ISSN 13826689. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668900000351>
- [18] BRONAUGH, Robert L. a Raymond F. STEWART. Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies IV: the Flow-Through Diffusion Cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1985, 74(1), 64-67 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1002/jps.2600740117. ISSN 00223549. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915465621>

- [19] NG, Shiow-Fern, Jennifer J. ROUSE, Francis D. SANDERSON, Victor MEIDAN a Gillian M. ECCLESTON. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2010, 11(3), 1432-1441 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1208/s12249-010-9522-9. ISSN 1530-9932.
Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1208/s12249-010-9522-9>
- [20] SCHMOOK, Fritz P., Josef G. MEINGASSNER a Andreas BILLIC, Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, 215(1-2), 51-56 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/S0378-5173(00)00665-7. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517300006657>
- [21] OECD. *Guidance Notes on Dermal Absorption – Series on Testing and Assessment No. 156* [online]. 2011, 36, 1-72 [cit. 2014-06-04]. Dostupné z: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/48532204.pdf>
- [22] DAO, Harry a Rebecca A. KAZIN. Gender differences in skin: A review of the literature. *Gender Medicine* [online]. 2007, 4(4), 308-328 [cit. 2017-01-12]. DOI: 10.1016/S1550-8579(07)80061-1. ISSN 15508579.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550857907800611>
- [23] HOLBROOK, Karen A. a George F. ODLAND. Regional Differences in the Thickness (Cell Layers) of the Human Stratum Corneum: An Ultrastructural Analysis. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 1974, 62(4), 415-422 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12701670. ISSN 0022202x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15442629>
- [24] SCHÄFER-KORTING, M., et al. Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study. *ATLTA* [online]. 2006, no. 34, p. 283–294. Dostupné z: <http://www.atla.org.uk/reconstructed-human-epidermis-for-skin-absorption-testing-results-of-the-german-prevalidation-study>
- [25] DAVIES, Diane J., Jon R. HEYLINGS, Timothy J. MCCARTHY a Catherine M. CORREA. Development of an in vitro model for studying the penetration of chemicals through compromised skin. *Toxicology in Vitro* [online]. 2015, 29(1), 176-181 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.09.012. ISSN 08872333.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233314001854>

- [26] JACVAM. *Guidelines for Percutaneous Absorption/Penetration* [online]. 2nd ed. JACVAM, 1997,
Dostupné z: http://www.jacvam.jp/files/doc/05_01/05_01_Z3.pdf.
- [27] SEMER, Nadine B. *Practical plastic surgery for nonsurgeons*. Philadelphia: Hanley & Belfus, c2001. ISBN 1560534788.
- [28] BARBERO, Ana M. a H. Frederick FRASCH. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicology in Vitro* [online]. 2009, 23(1), 1-13 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.tiv.2008.10.008. ISSN 08872333.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233308002658>
- [29] HOSTYNEK, Jurij J., Frank DREHER a Howard I. MAIBACH. Human skin retention and penetration of a copper tripeptide in vitro as function of skin layer towards anti-inflammatory therapy. *Inflammation Research* [online]. 2010, 59(11), 983-988 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1007/s00011-010-0214-4. ISSN 1023-3830.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-010-0214-4>
- [30] EINBINDER, Julia M, Richard A WALZER a Ines MANDL. Epidermal-Dermal Separation with Proteolytic Enzymes. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 1966, 46(5), 492-504 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1038/jid.1966.75. ISSN 0022202x.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15471179>
- [31] VAN DE SANDT, J.J.M., J.A. VAN BURGSTEDEN, S. CAGE, et al. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2004, 39(3), 271-281 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.yrtph.2004.02.004. ISSN 02732300.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230004000145>
- [32] DIEMBECK, W, H BECK, F BENECH-KIEFFER, et al. Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1999, 37(2-3), 191-205 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/S0278-6915(98)00114-8. ISSN 02786915.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691598001148>

- [33] SIMON C. WILKINSON AND FAITH M. WILLIAMS. *In vitro dermal absorption of liquids*. Sudbury: Great Britain, Health and Safety Executive, 2001. ISBN 0717620484.
- [34] CHILCOTT, Robert P., Christopher H. DALTON, Andrew J. EMMANUEL, Ceri E. ALLEN a Simon T. BRADLEY. Transepidermal Water Loss Does Not Correlate with Skin Barrier Function In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2002, 118(5), 871-875 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01760.x. ISSN 0022202x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15416562>
- [35] PLESSIS, Johan du, Aleksandr STEFANIAK, Fritz ELOFF, et al. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Research and Technology* [online]. 2013, 19(3), 265-278 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1111/srt.12037. ISSN 0909752x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/srt.12037>
- [36] RAVICHANDRAN, Supriya, Luke J. MORTENSEN a Lisa A. DELOUISE. Quantification of human skin barrier function and susceptibility to quantum dot skin penetration. *Nanotoxicology* [online]. 2010, 5(4), 675-686 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.3109/17435390.2010.537381. ISSN 1743-5390. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2010.537381>
- [37] DAVIES, D.J., R.J. WARD a J.R. HEYLINGS. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicology in Vitro* [online]. 2004, 18(3), 351-358 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.tiv.2003.10.004. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233303002029>
- [38] CHEN, Shuai, Ralf EINSPANIER a Jennifer SCHOEN. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 2015, 144(5), 509-515 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1007/s00418-015-1351-1. ISSN 0948-6143. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00418-015-1351-1>
- [39] LAWRENCE, J.N. Electrical resistance and tritiated water permeability as indicators of barrier integrity of in vitro human skin. *Toxicology in Vitro* [online]. 1997, 11(3), 241-249 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/S0887-2333(97)00015-5. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233397000155>

- [40] GUTH, Katharina, Monika SCHÄFER-KORTING, Eric FABIAN, Robert LANDSIEDEL a Ben VAN RAVENZWAAY. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. 2015, 29(1), 113-123 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.09.007. ISSN 08872333.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233314001714>
- [41] HRABÁLEK, A., et al. Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické listy* [online]. 1999, no. 93, p. 107–119. ISSN 1213-7103,
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_02_107-119.pdf
- [42] ZORIN, S. In vitro test of nicotine's permeability through human skin. *Risk evaluation and safety aspects. Annals of Occupational Hygiene* [online]. 1999, 43(6), 405-413 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1093/annhyg/43.6.405. ISSN 00034878.
Dostupné z: <http://annhyg.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/annhyg/43.6.405>
- [43] WU, Jianhong, Wei LIU, Chenbing XUE, et al. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology Letters* [online]. 2009, 191(1), 1-8 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.05.020. ISSN 03784274.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427409002707>
- [44] AKOMEAH, Franklin, Tahir NAZIR, Gary P. MARTIN a Marc B. BROWN. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2004, 21(2-3), 337-345 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.ejps.2003.10.025. ISSN 09280987.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098703003014>
- [45] SELZER, Dominik, Mona M.A. ABDEL-MOTTALEB, Tsambika HAHN, Ulrich F. SCHAEFER a Dirk NEUMANN. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, 65(2), 278-294 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.06.010. ISSN 0169409x.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002086>

- [46] ESCOBAR-CHAVEZ, Jose Juan, MERINO-SANJUÁN, V., LÓPEZ-CERVANTES, M., URBAN-MORLAN, Z., PIÑÓN-SEGUNDO, E., QUINTANAR-GUERRERO, D. and GANEM-QUINTANAR, A. TheTape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* [online]. 2008. Vol. 11, no. 1p. 104. DOI: 10.18433/j3201z. Dostupné z: <http://ejournals.library.ualberta.ca/index.php/JPPS/article/view/918/1134>
- [47] VERYSER, L. Transdermal Evaluation of Caffeine in Different Formulations and Excipients. *Journal of caffeine research* [online]. 2013, vol. 1, no. 3, p. 1–6. DOI: 10.1089/caf.2013.0002. Dostupné z: <https://biblio.ugent.be/publication/3173622/file/3173631.pdf>
- [48] ADAMI, G., F. LARESE, M. VENIER, P. BARBIERI, F. LO COCO a E. REISENHOFER. Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasolines through human abdominal skin in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. 2006, 20(8), 1321-1330 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.05.008. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088723330600083X>
- [49] SCHREIBER, S., A. MAHMOUD, A. VUIA, et al. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicology in Vitro* [online]. 2005, 19(6), 813-822 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.04.004. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233305000652>
- [50] SCHEUPLEIN, Robert J. a Irvin H. BLANK. Mechanism of Percutaneous Absorption. IV. Penetration of Nonelectrolytes (Alcohols) from Aqueous Solutions and from Pure Liquids. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 1973, 60(5), 286-296 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12723090. ISSN 0022202x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15440667>
- [51] HIGUCHI, Takeru. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1961, 50(10), 874-875 [cit. 2017-01-10]. DOI: 10.1002/jps.2600501018. ISSN 00223549. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915333037>

- [52] EVROPSKÁ UNIE. Směrnice rady č. 86/609/EHS ze dne 24. listopad 1986 o sblížení právních a správních předpisů členských států týkajících se ochrany zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely. V: *Úřední věstník evropských společenství*. 1986, částka 358, s. 292-320. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A31986L0609>
- [53] KUBINCOVÁ, L., NOVÁK, J., SOVADINOVÁ, L. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy* [online]. 2016, no. 110, p. 118–125. ISSN 1213-7103.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_02_118-125.pdf
- [54] PRIETO, P., et al. *EURL ECVAM strategy to replace, reduce and refine the use of animals in the assessment of acute mammalian systemic toxicity* [online]. 2014. Dostupné z: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC90611>. ISBN 978-92-79-38867-5
- [55] TICHÝ, M., et al. Alternativní metody testování toxicity chemických látek in silico. *Chemické listy* [online]. 2005, no. 99, p. 675–681. ISSN 1213-7103.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_675-681.pdf
- [56] W.M.S. RUSSELL AND R.L. BURCH. *The principles of humane experimental technique*. Special ed. South Mimms, Potters Bar, Herts, England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992. ISBN 0900767782
- [57] Balls M. 2010. The principles of humane experimental technique: timeless insights and unheeded warnings. *ALTEX* [online], 2010, 27, 19–23. ISSN 1868-8551.
Dostupné z: http://www.altex.ch/resources/altex_2010_SpecIss_rPL7_Balls.pdf
- [58] ED. BY KATHY LABER-LAIRD. *Handbook of rodent and rabbit medicine*. Oxford [u.a.]: Pergamon, 1996. ISBN 9780080425047.
- [59] EVROPSKÁ UNIE. Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1907 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. V: *Úřední věstník evropských společenství*. 2007, částka 136, s. 1-248. Dostupné z: [http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pravni_predpisy_chemicke_latky_2012/\\$FILE/oer-narizeni_1907-20070601.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pravni_predpisy_chemicke_latky_2012/$FILE/oer-narizeni_1907-20070601.pdf)

- [60] ČESKO. Zákon č. 246 ze dne 15. dubna 1992 na ochranu zvířat proti týrání.
V: *Sbírka zákonů České republiky*. 1992, částka 1284, s.1-110.
Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-246>
- [61] EVROPSKÁ UNIE. Směrnice rady č. 2003/15/ES ze dne 27. února 2003 o změně a doplnění směrnice rady 76/768/EHS o aproximacích právních předpisů členských států týkajících se kosmetických výrobků. V: *Úřední věstník evropských společenství*. 2003, částka 66, s. 26-35.
Dostupné z: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003L0015:CS:HTML>
- [62] SANTOYO, S., A. ARELLANO, P. YGARTUA a C. MARTIN. Penetration enhancer effects on the in vitro percutaneous absorption of piroxicam through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1995, 117(2), 219-224 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1016/0378-5173(94)00344-5. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378517394003445>
- [63] KUMAR, R., ANIL, P. Modified Transdermal Technologies: Breaking the Barriers of Drug Permeation via the Skin. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2007, vol. 6, no. 1, p. 633–644.
Dostupné z: <http://www.bioline.org.br/pdf?pr07002> . ISSN 1596-9827
- [64] FRASCH, H Frederick, G Scott DOTSON, Annette L BUNGE, et al. Analysis of finite dose dermal absorption data: Implications for dermal exposure assessment. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* [online]. 2013, 24(1), 65-73 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1038/jes.2013.23. ISSN 1559-0631. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jes.2013.23>
- [65] POET, Torika S. a James N. MCDOUGAL. Skin absorption and human risk assessment. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2002, 140(1), 19-34 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1016/S0009-2797(02)00013-3. ISSN 00092797.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279702000133>
- [66] BLANK, Irvin H. a Daniel J. MCAULIFFE. Penetration of Benzene Through Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 1985, 85(6), 522-526 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12277325. ISSN 0022202x.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15438461>

- [67] MCDOUGAL, J. N. Assessment of Skin Absorption and Penetration of JP-8 Jet Fuel and Its Components. *Toxicological Sciences* [online]. January 2000. Vol. 55, no. 2p. 247–255. DOI 10.1093/toxsci/55.2.247. Dostupné z: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/55/2/247.long>
- [68] TSURUTA, Hiroshi. Percutaneous absorption of organic solvents. III. On the penetration rates of hydrophobic solvents through the excised rat skin. *INDUSTRIAL HEALTH* [online]. 1982, 20(4), 335-345 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.2486/indhealth.20.335. ISSN 0019-8366. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/indhealth1963/20.335?from=CrossRef>
- [69] LODÉN, Marie. The in Vitro Permeability of Human Skin to Benzene, Ethylene Glycol, Formaldehyde, and n-Hexane. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* [online]. 1986, 58(5), 382-389 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1986.tb00126.x. ISSN 00016683. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0773.1986.tb00126.x>
- [70] HANKE, Janusz, Tadeusz DUTKIEWICZ a Jerry PIOTROWSKI. The Absorption of Benzene through Human Skin. *International Journal of Occupational and Environmental Health* [online]. 2013, 6(2), 104-111 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1179/oeh.2000.6.2.104. ISSN 1077-3525. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/oeh.2000.6.2.104>
- [71] FRANZ, T.J., 1984. Percutaneous absorption of benzene. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, 6, 61-70. ISSN 0276-5063.
- [72] BRAIN, K.R., K.A. WALTERS, D.M. GREEN, S. BRAIN, L.J. LORETZ, R.K. SHARMA a W.E. DRESSLER. Percutaneous penetration of diethanolamine through human skin in vitro: Application from cosmetic vehicles. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2005, 43(5), 681-690 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1016/j.fct.2004.12.021. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691505000256>
- [73] SUN, James D., Joyce L. BESKITT, Marilyn J. TALLANT a Stephen W. FRANTZ. In Vitro Skin Penetration of Monoethanolamine and Diethanolamine Using Excised Skin from Rats, Mice, Rabbits, and Humans. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology* [online]. 2008, 15(2), 131-146 [cit. 2017-01-13]. DOI: 10.3109/15569529609048869. ISSN 0731-3829. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15569529609048869>

- [74] HOLMGAARD, Rikke; NIELSEN, Jesper Bo. *Dermal Absorption of Pesticides: Evaluation of Variability and Prevention*. Danish Environmental Protection Agency, 2009.
- [75] VAN DE SANDT, Johannes JM, et al. Comparative in vitro–in vivo percutaneous absorption of the pesticide propoxur. *Toxicological sciences*, 2000, 58.1: 15-22.
- [76] CLOWES, H.M., R.C. SCOTT a J.R. HEYLINGS. Skin absorption: Flow-through or static diffusion cells. *Toxicology in Vitro* [online]. 1994, 8(4), 827-830 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1016/0887-2333(94)90078-7. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0887233394900787>
- [77] NGAWHIRUNPAT, Tanasait, Praneet OPANASOPIT a Sompol PRAKONGPAN. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2004, 58(3), 645-651 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.05.002. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964110400133X>
- [78] QVIST, Michael H, Ulla HOECK, Bo KREILGAARD, Flemming MADSEN a Sven FROKJAER. Evaluation of Göttingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2000, 11(1), 59-68 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1016/S0928-0987(00)00091-9. ISSN 09280987. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098700000919>
- [79] KANIKKANNAN, Narayanasamy, Reena PATEL, Tanise JACKSON, Madhu Sudhan SHAIK a Mandip SINGH. Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). *Toxicology* [online]. 2001, 161(1-2), 1-11 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00402-9. ISSN 0300483x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X00004029>
- [80] GALEY, William R, H K LONSDALE a Sergio NACHT. The In Vitro Permeability Of Skin And Buccal Mucosa To Selected Drugs And Tritiated Water. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 1976, 67(6), 713-717 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12598596. ISSN 0022202x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15449334>

- [81] CHEDGZOY, Paula, Gareth WINCKLE a Charles M. HEARD. Triclosan: release from transdermal adhesive formulations and in vitro permeation across human epidermal membranes. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, 235(1-2), 229-236 [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00992-9. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301009929>
- [82] PERKINS, Nia C. a Charles M. HEARD. In vitro dermal and transdermal delivery of doxycycline from ethanol/migliol 840 vehicles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1999, 190(2), 155-164 [cit. 2017-01-11].
DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00240-9. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517399002409>
- [83] DAVIES, D.J., R.J. WARD a J.R. HEYLINGS. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicology in Vitro* [online]. 2004, 18(3), 351-358 [cit. 2017-01-11].
DOI: 10.1016/j.tiv.2003.10.004. ISSN 08872333.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233303002029>
- [84] FRANZ, Thomas J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. *Journal of Investigative Dermatology* [online].
1975, 64(3), 190-195 [cit. 2017-01-11]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12533356. ISSN 0022202x.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15444835>