

DOPLŇEK

V současné době nejsou známy bližší informace o dermální absorpci většiny chemických látek. Vzhledem k omezenému používání zvířat v experimentech většina těchto informací bude v budoucnu pocházet z testů *in vitro*. Souhrn a diskuse různých doporučení a našich zkušeností s těmito testy je náplní tohoto Doplňku.

1. Penetrační membrána

„Zlatým standardem“ pro testování dermální absorpce chemických látek *in vitro* je lidská kůže. Nejčastěji je získávána od dárců při plastických operacích břicha a prsů (je nezbytný informovaný souhlas dárce a schválení příslušnou etickou komisí). Ideálně by kůže neměla být ošetřena dezinfekcí, neboť ta může poškozovat kožní bariéru, ale to je v reálném životě nemožné. Jinou možností je získání kůže z tkáňové banky, většinou od kadáverových dárců. Lidskou kůži je též možné zakoupit komerčně, její nákup je však velmi finančně nákladný.

Alternativou k lidské kůži je použití kůží zvířecích. Nejčastěji je doporučována kůže prasečí, neboť je lidské kůži nejpodobnější. Oba tyto živočišné druhy v průběhu evoluce přirozeně ztratily ochlupení a z toho důvodu byly nuceny vyvinout jiný typ ochrany, tvořený specifickým složením epidermis a rohové vrstvy¹. Použití lze kůži břicha, hrudníku, zad; velmi vhodné je použití kůže zadní strany ušního boltce, která je tenká (na dolním zevním okraji ucha je tloušťka okolo 1 mm), neobsahuje podkoží a svojí anatomickou stavbou je nejvíce podobná kůži lidské². Ušní boltce je také možné relativně snadno získat nákupem na jatkách, je ale důležité, aby byly odebrány ještě před spařením prasete (spařená kůže má odstraněnu epidermis a tím pádem i rohovou vrstvu, místo kožní bariéry).

Další alternativou je použití komerčně dostupných modelů rekonstruované lidské epidermis nebo kůže, ale ty stále ještě nedosahují vlastností a funkce přirozené kůže, chybí jim zejména rohovatění vrchní vrstvy epidermis a přítomnost kožních adnex³. Příkladem jsou např. modely Episkin, SkinEthic, EpiDerm a jiné. Pro testování absorpce chemických látek zatím nejsou doporučovány, mohou však být použity pro testy dermální iritace, korozivnosti, fototoxicity a genotoxicity⁴.

Další možností je použití různých syntetických membrán. Na začátku našich experimentů bylo testováno použití syntetické membrány Strat-M (Merck), která je výrobem doporučována jako model pro predikci absorpce lidské kůže bez variability mezi šaržemi a bez limitů ve skladování⁵. Její výsledky (data nejsou prezentována) se však výrazně odlišovaly od použitých kůží. Dalším nedostatkem této membrány byla netěsnost spojení mezi ní a částmi difuzních komůrek, a proto bylo od jejího dalšího použití ustoupeno.

Kůži (lidskou nebo prasečí) je možné používat v plné tloušťce, doporučuje se tloušťka do 1 mm. Je též možné používat kůži tzv. dermatomovanou, která je pomocí

speciálního „nože“ (dermatomu) seříznuta na tloušťku 200–500 μm . Tato kůže obsahuje epidermis (je zachována kožní bariéra) a pouze horní část dermis, která může snižovat absorpci zejména lipofilních látek. Dermatomovaná kůže je pro použití v testech preferována, nevýhodou je ale vysoká finanční náročnost pořízení dermatomu a nutnost získání zručnosti s jeho používáním. K testování je též možné použít pouze epidermální membránu, v našich experimentech nebyla použita (membrána je velmi fragilní, zůstávají v ní otvory po prostupu chlupů, které se musí hydratací v komůrce „zatăhnout“). Postup její přípravy popisují např. Akomeah a spol.⁶

Kůži je možné používat čerstvou – pokud je cílem studie testování metabolismu látky v kůži, je vhodné použít kůži do 2 dnů po odběru⁷; k testování absorpce dané látky je možné použít kůži skladovanou při 4 °C po dobu 2–4 týdnů⁸. Častěji však bývá používána kůže zmrazená. Ta již nemá zachovaný aktivní enzymatický systém, ale kožní bariéra je ovlivněna minimálně. Kůže má být skladována při –20 °C (zabalena do aluminiové folie a lépe ještě v polyethylenovém sáčku) a je použitelná po dobu 1 roku⁹. Je však nutno brát v úvahu skutečnost, že se zvyšující se dobou skladování se zvyšuje její propustnost¹⁰, proto někteří autoři doporučují skladování kratší, např. u prasečí kůže do 2 měsíců¹¹. V průběhu skladování dochází k jejímu vysušování a tím k mírnému narušení bariéry (proto je vhodné po zamontování kůže do FDC před aplikací testované látky nechat kůži alespoň 30 min rehydratovat receptorovou tekutinou).

Při provádění našich experimentů jsme používali kůži prasečího břicha a ucha, kterou jsme porovnávali s lidskou kůží. Po uvážení všech výše popisovaných skutečností a výsledků provedených testů jsme se pro naši certifikovanou metodiku rozhodli jako nevhodnější používat zmrazenou kůži zadní strany prasečího boltce.

2. Testování integrity kůže

Nedílnou součástí testu je kontrola integrity kůže, neboť i malé poškození kožní bariéry významně ovlivňuje absorpční vlastnosti kůže. Na základě literární rešerše a vlastních pozorování za nejdůležitější považujeme důkladnou vizuální kontrolu – kůže musí být bez viditelných poranění, stroupeků, zánětlivých projevů apod. Doporučuje se její prohlédnutí lupou¹² nebo proti zdroji světla. Velmi vhodné je též sledování vlhkosti kůže po jejím zamontování a aklimatizaci v difuzní komůrce. Ackermann a spol.¹³ doporučují vyřadit vzorky, u nichž je po 30 min ekvilibrace přítomna vlhkost na povrchu kůže, normální neporušená kůže je po této době na povrchu mírně oschlá.

Po umístění do difuzních komůrek je možné kontrolovat elektrický odpor kůže kladený průchodem elektrického proudu (transcutaneous electrical resistance, TER), který se při poškození kožní bariéry snižuje. Pořízení vhodného přístroje není finančně náročné (je doporučován přístroj

pracující s frekvencí 50–100 Hz, používající napětí 1–3 V a měřící v rozmezí 0,1–30 k Ω (cit.¹⁴). Doporučení limitních hodnot se v literatuře liší, v našich testech jsme používali hodnotu 1,57 k Ω /cm², kterou doporučuje pro plnou prasečí kůži Davies a spol.¹¹. Postup: na ekvilibrovanou kůži (kůže alespoň 30 min zamontovaná v FDC a umístěná v temperující lázni nebo boxu) aplikovat 0,5 ml fyziologického roztoku a potom zavést jednu elektrodu přístroje odběrovým raménkem do akceptorové části komůrky a druhou ponořit do kapky fyziologického roztoku (pokrývající celý absorpční povrch kůže) tak, aby se nedotýkala povrchu kůže. Na přístroji odečíst hodnotu odporu kladeného kůži, přepočítat podle velikosti absorpční plochy (na k Ω /cm²).

Další možností je hodnocení ztráty vody kůži (transepidermal water loss, TEWL), která se při poškození kožní bariéry zvyšuje. Existují různé typy měřicích přístrojů, nevýhodou jejich pořízení je poměrně vysoká cena. Doporučení limitujících hodnot v literatuře se opět různí (obvykle se pohybují v rozmezí 2–30 g/m²/h). Pro naše testování byla jako vyřazovací hodnota použita hodnota nad 15 g/m²/h, kterou pro kůži prasečího ucha a stejný typ přístroje použili Duracher a spol.¹⁵. Postup: FDC s ekvilibrovanou kůží (po cca 30 min od zamontování) vyndat z vodní lázně, osušit komůrku, sondu přístroje přiložit na povrch kůže a provést měření. V našich experimentech bylo měření prováděno po dobu 1 min, výsledná průměrná hodnota byla odečtena v příslušném počítačovém programu přístroje.

K hodnocení integrity kůže je možné použít další metody, jejich výčet je ale nad rámec této publikace a vzhledem k jejich méně častému použití (dle literatury) a možným negativním vlivům na kožní bariéru zde nebudou probírány.

Názory na použití vhodné kontroly integrity kůže se v literatuře různí, všichni autoři se však shodují na důkladné vizuální kontrole a *ex post* vyřazení všech výrazně odlišných vzorků.

3. Difuzní komůrky

Základním laboratorním zařízením pro testování dermální absorpce chemických látek jsou difuzní komůrky. Používají se různé typy – horizontální nebo vertikální, statické nebo průtokové, s různou velikostí absorpční plochy a akceptorové části. Směrnice Evropské komise¹⁶ požaduje minimální velikost absorpční plochy 0,64 cm² a objem akceptorové části komůrky doporučený OECD je 2–20 ml (cit.⁷). Velikost receptorové části ovlivňuje interval odběrů vzorků receptorové tekutiny, u malých komůrek jsou třeba odběry častější, aby byla zachována jedna z podmínek správného průběhu testu a to zachování tzv. „sink conditions“ – pro správný průběh absorpce je třeba, aby koncentrace testované látky v receptorové tekutině nepřekročila 10 % (cit.¹⁷), dle jiných autorů 20 % (cit.⁶) její možné maximální rozpustnosti v dané tekutině.

V praxi převažuje používání statické horizontální komůrky, tzv. Franzovy difuzní cely¹⁸ (FDC), viz obr. 2 v

článku. Komůrky je možné zakoupit od komerčních dodavatelů nebo použít komůrky zhotovené lokálním sklářem. V námi prováděných experimentech byly použity 2 typy cel zakoupených od firmy Copley Scientific (komůrky s klipem a šroubovací) a komůrky vyrobené lokálním sklářem. Výhody zakoupených komůrek: všechny mají stejný objem akceptorové části, po umístění kůže do komůrky je hladina RT v odběrovém raménku v úrovni kůže. Nevýhody: hlavní nevýhodou je vysoká cena. U šroubovacích komůrek docházelo při upevňování kůže mezi donorovou a akceptorovou část ke shrnování kůže, komůrky s klipem měly krátká raménka klipu a dodané klipy bylo možné použít jen na dermatomovanou kůži (i když dle specifikace výrobce měly být použitelné též pro plnou kůži), nebo na umělou membránu Strat-M (a zde netěsnily, docházelo k úniku RT ve spoji mezi donorovou a akceptorovou částí komůrky). Při použití plné kůže bylo potřeba zvolit jiný způsob spojení donorové a akceptorové části (byly vyrobeny nové klipy). Komůrky zhotovené sklářem jsou mnohem levnější, ale akceptorové části komůrek mívají mírně odlišný objem, což při aplikaci standardního množství RT vede k tomu, že hladina v odběrovém raménku je v různé úrovni a díky tomu se vyklenuje nebo propadá kožní membrána a při následné aplikaci testované látky potom tato není rovnoměrně rozprostřena po povrchu membrány. Tomu se dá zabránit použitím různého množství RT v akceptorové části komůrky (tak, aby byla hladina v odběrovém raménku v úrovni penetrační membrány), což komplikuje přepočty výsledků absorpce (každou FDC je potřeba počítat s jiným objemem RT). V testech nebyl prokázán vliv typu komůrky na transdermální absorpci dané látky, vliv na rozhodnutí o vhodnosti daného typu komůrky byl dán podmínkami manipulace s komůrkami.

Doporučený počet použitých komůrek v testu se různí. V našich experimentech bylo v souladu s doporučením EFSA (cit.¹⁹) užíváno 8 + 4 FDC – tj. 8 testovacích komůrek (s aplikací testované látky), po 2 kusech od 4 různých dárců + 4 kontrolní FDC (bez aplikace testované látky) s kůží od 4 dárců. Jiná doporučení uvádí 6 + 3 komůrky (6 testovacích, po 2 vzorcích od 3 dárců + 3 kontrolní s kůží 3 dárců²⁰), minimum jsou 4 difuzní komůrky (blíže nespecifikované²¹).

Po dobu experimentu je třeba udržovat stabilní teplotu povrchu kůže a pohyb receptorové tekutiny. V našich experimentech byly používány dva systémy – temperovaný magnetický blok od firmy Copley Scientific a aparatura sestávající z temperované magnetické desky IKAMAG-RT 15 a sklářem vyrobené nádoby s držákem FDC (viz Článek, obrázek 3). Manipulace s blokem je jednodušší (sám automaticky reguluje teplotu systému), jeho pořízení je však finančně náročné a umožňuje použití pouze omezeného počtu komůrek. Pořízení sestavené aparatury je levnější a umožňuje použití většího množství cel v experimentu, je však třeba hlídat teplotu povrchu kůže a hladinu vody v nádobě (má být co nejvyšší, ale nesmí se dotýkat kůží).

4. Donorový roztok – testovaná látka a rozpouštědlo

Různé chemické látky mají různou schopnost dermální absorpce, která může být ovlivňována mnoha faktory. Prvním z nich je rozpustnost látek ve vodě, která může být popsána pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol-voda ($\log K_{O/W}$, nebo $\log P$). Hodnoty $\log K_{O/W}$ jsou obvykle mezi -3 (velmi hydrofilní) a $+10$ (extrémně hydrofobní). Látky hydrofilní prochází obtížněji přes bariéru v rohové vrstvě epidermis, ve vodném prostředí zbývající epidermis a dermis se naopak transportují snadno. Látky hydrofobní (lipofilní) prochází dobře přes rohovou vrstvu (mohou se zde kumulovat), ve vodném prostředí dalších vrstev kůže se ale jejich transport zpomaluje. Maximální absorpci mají látky s $\log K_{O/W}$ 1–2, u látek s $\log K_{O/W} > 3,5$ se absorpce snižuje²². Další důležitou vlastností je velikost molekuly, dobře penetrují látky s molekulární hmotností do 500 Daltonů (cit.²³).

Z námi testovaných látek měla nejmenší molekulární hmotnost kyselina benzoová ($122,12 \text{ g mol}^{-1}$, $\log K_{O/W} = 1,87$), poté kofein ($194,19 \text{ g mol}^{-1}$, $\log K_{O/W} = -0,07$) a největší testosteron ($288,42 \text{ g mol}^{-1}$, $\log K_{O/W} = 3,32$). Tomu odpovídaly i výsledky testů – nejrychlejší a nejvyšší byla absorpce kyseliny benzoové, nejnižší a nejpomalejší u testosteronu (viz Výsledky v článku).

Vzhledem k tomu, že dermální absorpce probíhá metodou pasivní difuze látky přes membránu, velký význam má i koncentrace donorového roztoku, vyšší koncentrace vede k vyšší absorpci. Při testování penetrace se obvykle volí koncentrace odpovídající reálnému použití dané látky. V našich experimentech byla kvůli porovnání s publikací van de Sandta a spol.²⁴ (s výsledky z 10 laboratoří) zvolena stejná koncentrace jako v této publikaci, tj. 4 mg ml^{-1} a bylo zvoleno stejné rozpouštědlo (ethanol-voda 1 : 1) a dávka ($25 \mu\text{l}$).

Jako rozpouštědlo může být teoreticky použita jakákoliv látka. Důležité je, aby testovaná látka v ní byla dobře rozpustná a aby nepoškozovala kůži a kožní bariéru. Některá rozpouštědla mohou totiž absorpci zvyšovat (enhancery) a jiné snižovat (retardéry)²⁵.

Dalším, co ovlivňuje absorpci, je množství aplikované látky a okluze. Testovaná látka může být na kůži aplikována dvojitým typem dávky. První typ dávky, tzv. „konečná dávka“ (finite dose) se používá pro studie imitující reálné použití testované látky. Dávka látky je aplikována v množství postačujícím k pokrytí kůže (obvykle $1\text{--}5 \text{ mg cm}^{-2}$ nebo $10 \mu\text{l cm}^{-2}$) a kůže je ponechána bez okluze – může tedy dojít k odpaření určitého množství aplikované látky, jako je tomu v reálném životě. Při druhém typu dávky, tzv. „nekonečné dávce“ (infinite dose), je testovaná látka aplikována v nadbytku (obvykle $>10 \text{ mg cm}^{-2}$ nebo $>100 \mu\text{l cm}^{-2}$) a může nebo nemusí být použita okluze pro eliminaci odparu (použití okluze vede ke zvýšení absorpce)⁹.

5. Receptorová tekutina

Receptorová (nebo akceptorová) tekutina (RT) má napodobovat podmínky vnitřního prostředí organismu (krve, mízy). Opět nesmí poškozovat kůži a musí zajistit dobrou rozpustnost testované látky. Pro testování hydrofilních látek se používají vodné roztoky solí nebo pufované roztoky solí s pH 7,4 (odpovídá vnitřnímu prostředí organismu), často např. fyziologický roztok nebo PBS pufr. Při testování lipofilních látek je třeba do vodného roztoku přidat něco, co umožní jejich rozpustnost (např. bovinní sérový albumin, BSA), nebo použít organická rozpouštědla nepoškozující membránu (např. ethanol-voda 1 : 1, 6% polyethylenglykol, 20% oleyl ether ve vodě)²⁵. V našich experimentech byl v souladu s prací van de Sandta a spol.²⁴ používán fyziologický roztok pro testování absorpce kofeinu a kyseliny benzoové, pro test absorpce testosteronu k němu bylo přidáno 5 % BSA, což odpovídá množství albuminu v krvi.

Před započítáním testů transdermální absorpce *in vitro* je třeba zjistit (z literatury nebo experimentálně) rozpustnost testované látky v receptorové tekutině kvůli podmínkám zachování „sink conditions“ (viz Doplňek, kap. 3). V našich testech byla tato rozpustnost měřena experimentálně – testovaná látka (v nadbytku) byla rozpouštěna v příslušné RT po dobu 24, 48 a 72 h na termostatickém míchadle (250 rpm , $30 \text{ }^\circ\text{C}$), potom byla za občasného míchání ponechána 24 h při pokojové teplotě. Poté byl odebrán vzorek, zfiltrován přes stříkačkový filtr ($0,2 \mu\text{m}$), $100\times$ zředěn a zanalyzován pomocí validované metody HPLC. Experimentálně zjištěná rozpustnost kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku byla $2,47 \text{ g l}^{-1}$, rozpustnost kofeinu $20,1 \text{ g l}^{-1}$ a rozpustnost testosteronu v RT byla $0,23 \text{ g l}^{-1}$.

6. Průběh testu

Průběh testu je podrobně popsán v článku (kap. Metodika), zde zmíníme jen několik postřehů.

Důležitá je kontrola přítomnosti bublin pod membránou v receptorové části komůrky, neboť ty brání absorpci látky do RT. Proto je vhodné před a v průběhu testu jejich přítomnost kontrolovat a přítomné bubliny odstraňovat polohováním cely. Zároveň má význam typ zvolené RT, při použití fyziologického roztoku nebo PBS pufru bylo pozorováno méně vznikajících bublin než při použití Hanksova pufru (vlastní pozorování při jiných experimentech, nehodnoceno statisticky).

Dalším faktorem výrazně ovlivňujícím výsledek jsou vhodně zvolené intervaly odběru RT. Proto se doporučuje před vlastním testem provést pilotní test s menším počtem difuzních komůrek a častějšími intervaly odběru receptorové tekutiny (např. v čase 10, 20, 40 min a pak 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 h). Pro dobré vykreslení křivky absorpce se nám v testovacích experimentech osvědčilo mít alespoň 6–8 odběrů RT v časech, které zejména pokrývají dobu začátku průniku látky do RT a pak také období, kdy se absorpce začíná snižovat, případně zastavovat. Použití velkého množství odběrů v kratších intervalech je

v testovacích experimentech též možné, ale zbytečně zvyšuje finanční náročnost experimentu (v závislosti na použité analytické metodě).

Doba trvání experimentu bývá různá, měla by být delší než 2,7násobek doby lag time²⁶. Při testování látek používaných v reálných situacích se doporučuje volit dobu testu podle doby expozice dané látky (např. 8 h pro pracovní expozice). Při experimentálním testování se obvykle používá doba 24 h, při delší době již může docházet k poškození kůže a je vhodné proto do RT přidat konzervační látky, nejčastěji antibiotika (penicilin, streptomycin)²⁵. V naší metodice, určené v budoucnu pro testování chemických látek s neznámou absorpcí, doporučujeme ponechat základní dobu trvání testu 24 h s tím, že dle výsledků pilotních testů může být potom pro konkrétní testovanou látku modifikována (zkrácena nebo prodloužena).

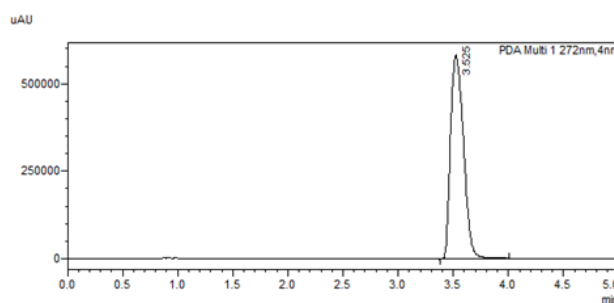
7. Laboratorní zpracování vzorků

V našich experimentech byla receptorová tekutina analyzována metodou HPLC, jednotlivé metodiky stanovení byly vyvinuty a pro každý analyt předem zvalidovány na Oddělení analytiky VUOS (podrobně viz článek; chromatogramy jednotlivých látek jsou na obr. 1–3 zde v Doplňku).

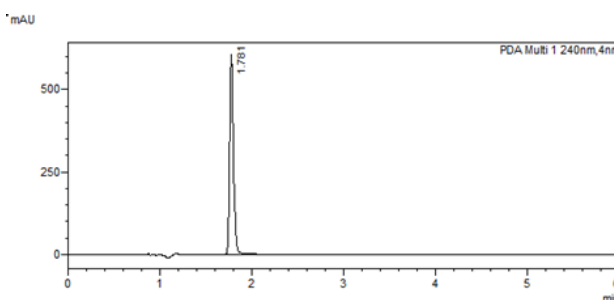
Pro podmínky námi vyvíjené metodiky stačila pouze analýza receptorové tekutiny, je však možné zjišťovat i tzv. total recovery, kdy je testovací systém rozdělen na jednotlivé části (stěr z povrchu kůže + epidermis / z epidermis je možné oddělit rohovou vrstvu tzv. stripováním/ + dermis + receptorová tekutina⁹). Testovanou látku je potom třeba převést do vhodného rozpouštědla a pak analyzovat zvoleným způsobem (např. HPLC). Tato metoda je určitým způsobem limitována rozpustností testované látky v RT a eluentu, proto se pro stanovení total recovery doporučuje použít k testování radiačně značené látky. Průběh testu je stejný, liší se způsob detekce látky – pomocí scintigrafu je přímo měřena v jednotlivých oddělených kompartmentech (není nutné ji převádět do roztoku). Nevýhodou je vysoká cena a obtížná dostupnost radiačně značených testovaných látek a nutnost speciálního pracoviště s povolením Státního úřadu pro jadernou bezpečnost²⁷. Metodika testování dermální penetrace radiačně značených látek byla též součástí grantu TAČR a ve VUOS Rybitví certifikována v roce 2021 (data zde nejsou prezentována vzhledem k rozsahu článku a menší předpokládané použitelnosti metodiky odbornou veřejností).

8. Matematické hodnocení výsledků

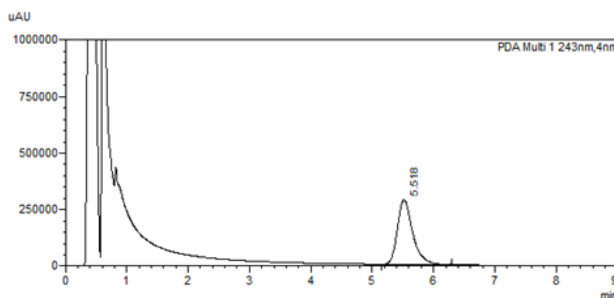
Hodnoty koncentrace testované látky v RT získané HPLC analýzou je třeba přepočítat na množství látky absorbované v daných časových intervalech. Od těchto hodnot je třeba odečíst hodnoty získané při analýze kontrolních vzorků (FDC bez aplikace testované látky). Zatímco kofein a testosteron nebyly v kontrolních vzorcích nalezeny, u kyseliny benzoové tvořily nálezy v kontrolních vzorcích až nižší jednotky procent nálezu koncentrace v RT v daném čase. Benzoová kyselina se nachází běžně v těle



Obr. 1. Chromatografický záznam kofeinu (50 mg l⁻¹ ve fyziologickém roztoku)



Obr. 2. Chromatografický záznam kyseliny benzoové (50 mg l⁻¹ ve fyziologickém roztoku)

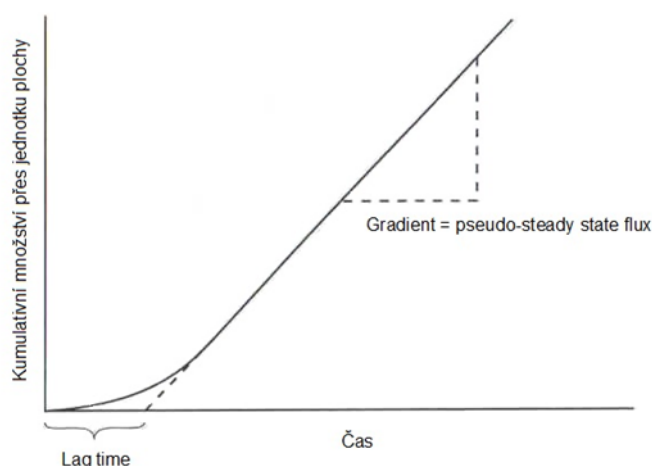


Obr. 3. Chromatografický záznam testosteronu (50 mg l⁻¹ ve fyziologickém roztoku s 5 % BSA)

živočichů, přirozeně vzniká např. při metabolismu zrnin a ovoce, uměle je používána potravinářským průmyslem jako aditivum, přidává se jako konzervant do kosmetických přípravků²⁸. Proto může být přítomna v kůži prasat i lidí a tato (námi předem neočekávaná) přítomnost názorně ukazuje důležitost kontrolních vzorků.

Z hodnot absorpce testované látky v jednotlivých časových intervalech se potom sestaví graf dané absorpce (viz obr. 4) a z něj je možno vypočítat základní parametry absorpce – flux a lag time.

Hodnota fluxu se počítá pomocí lineární regrese přímé části grafu absorpce (v grafu přímka procházející inflexním bodem křivky) podle rovnice přímky ($y = kx + q$). Hodnota flux odpovídá směrnici přímky (k) a hodnota lag



Obr. 4. Křivka absorpce při aplikaci infinite dose na kožní membránu (modifikováno podle Williams²⁶)

time je dána hodnotou x pro $y = 0$ (v grafu čas průniku přímky a osy x). Vzhledem k tomu, že neexistuje oficiální doporučení, které body by měly být zahrnuty do vytvoření křivky a hodnocení pomocí lineární regrese, může být posuzování hodnot absorpce různými hodnotiteli zatíženo poměrně velkou interindividuální chybou²⁹. Proto byl k výpočtům fluxu a lag time používán volně dostupný a pro tyto účely vyvinutý automatizovaný program SAMPA (cit.³⁰).

Dalším důležitým parametrem absorpce je množství látky vstřebané do receptorové tekutiny, což ilustruje množství, které se v reálné expozici stává systémově dostupným. V našich experimentech jde o podíl látky nalezené v RT v poměru k aplikovanému množství. Při analýze total recovery se jako vstřebané bere množství v epidermis + dermis + RT; z hodnocení se vylučuje množství ve stěru z povrchu kůže a v prvních 2 stripech rohové vrstvy. Při této analýze by mělo být po součtu jednotlivých kompartmentů nalezeno $100 \pm 10\%$ (cit.⁷) nebo $100 \pm 15\%$ (cit.²⁰) aplikované dávky.

Při hodnocení dermálních absorpcí bývá často kriticky poukazováno na velké rozptyly dosažených výsledků. To je dáno typy použitých kůží (jsou velké mezidruhové rozdíly, proto bývá doporučováno pro získání výsledků používaných v aplikacích pro lidi používat lidskou a případně prasečí kůži; jiné živočišné druhy nejsou doporučovány²⁵), rozdíly jsou ale i v rámci jednoho druhu mezi jedinci a též mezi kůží z různých partií těla téhož jedince²⁶. Velký význam má i tloušťka použité kůže. V našich experimentech byly používány kůže o různé tloušťce, což dle očekávání vedlo k velkému rozptylu výsledných veličin charakterizujících dermální absorpci. Získané hodnoty ale korespondují s výsledky publikovanými v práci van de Sandta a spol.²⁴ pro různé tloušťky lidské kůže (viz v článku tab. III). Jak je vidět i z publikovaných rozpětí výsledků testů dermální absorpce kyseliny benzoové, kořenu a testosteronu provedených v 9 laboratořích na lid-

ské kůži podle stejného protokolu (stejná koncentrace testované látky, stejné rozpouštědlo a RT), hodnoty absorpce jednotlivých látek se významně (mnohonásobně) liší. Pro validaci naší metodiky bylo důležité, že se naše výsledky získané na prasečí kůži nalézají v rozmezí publikovaných hodnot pro lidskou kůži a tudíž námi použitá metodika mohla být (a byla) certifikována.

LITERATURA

1. Forslind B., Norlén L., Engblom J.: *Progr. Colloid Polym. Sci.* 108, 40 (1998).
2. Jacobi U., Kaiser M., Toll R., Mangelsdorf S., Audring H., Ostberg N., Sterry W., Lademann J.: *Skin. Res. Technol.* 13, 19 (2007).
3. Ponc M.: *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54 Suppl 1, 19 (2002).
4. OECD (2021), Test No. 439 In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
5. Strat-M Membrane, Merck, <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/life-science-research/drug-discovery-development/strat-m-transdermal-diffusion-membrane/> yrOb.qB.rIAAAE_5nsRHeiO,nav, staženo 8. 3.2022.
6. Akomeah F. K., Martin G. P., Brown M. B.: *J. Pharm. Sci.* 96, 824 (2007).
7. OECD (2004), Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies, OECD Series on Testing and Assessment, No 28. OECD Publishing, Paris.
8. DeBono R., Rao G. S., Berry R. B.: *Plast. Reconstr. Surg.* 102, 78 (1998).
9. WHO (2006), Environmental Health Criteria 235 – Dermal Absorption: 1. vyd., WHO Press, Geneva.
10. Ahlstrom L. A., Cross S. E., Mills P. C.: *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 456 (2007).

11. Davies D. J., Ward R. J., Heylings J. R.: *Toxicol. In Vitro* 18, 351 (2004).
12. Henning A., Neumann D., Kostka K. H., Lehr C. M., Schaefer U. F.: *Skin Pharmacol. Physiol.* 21, 81 (2008).
13. Ackermann K., Borgia S. L., Korting H. C., Mewes K. R., Schaefer-Korting M.: *Skin Pharmacol. Physiol.* 23, 105 (2010).
14. OECD (2015), Test No. 430: In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method. OECD Publishing, Paris.
15. Duracher L., Blasco L., Hubaud J. C., Vian L., Marti-Mestres G.: *Int. J. Pharmacol.* 374, 39 (2009).
16. EU-SCCP (2006), Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, SCCP/0970/06. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pfd, staženo 8. 3. 2022.
17. Selzer D., Abdel-Mottaleb M. M., Hahn T., Schaefer U. F., Neumann D.: *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 65, 278 (2013).
18. Franz T. J.: *J. Invest. Dermatol.* 64, 190 (1975).
19. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR); Guidance on Dermal Absorption. *EFSA Journal* 10, 2665 (2012).
20. EU-SCCNFP (2003), Basic Criteria for the In Vitro Assesment of Dermal Absorption of Cosmetic Ingredients, SCCNFP/0750/03. https://ec.europa.eu/health/aarchive/ph_risk/committees/sccp/documents/out231_en.pdf, staženo 8. 3. 2022.
21. OECD (2004), Test No. 428: Skin Absorption: In vitro method: OECD Publishing, Paris.
22. Kezic S., Nielsen J. B.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82, 677 (2009).
23. Bos J. D., Meinardi M. M.: *Exp. Dermatol.* 9, 165 (2000).
24. van de Sandt a 17 spoluautorů: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39, 271 (2004).
25. OECD (2019), OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 156 – Guidance Notes on Dermal Edition: Draft Second Edition. https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Guidance%20Notes%20Dermal%20Absorption%20156_Oct2019_clean.pdf, staženo 8. 3. 2022.
26. Williams A. C.: *Transdermal and Topical Drug Delivery from Theory to Clinical Practice*. Pharmaceutical Press, London 2003.
27. Zákon č. 263/2016 Sb. atomový zákon. Sbíрка zákonů č. 263/2016, částka 102, str. 3938.
28. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety (2000). Benzoic acid and sodium benzoate. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43210/964153026X.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, staženo 8. 3. 2022.
29. Niedorf F., Schmidt E., Kietzmann M.: *Altern. Lab. Anim.* 36, 201, 2008.
30. Bezrouk A., Fiala Z., Kotingová L., Krulichová I. S., Kopečná M., Vávrová K.: *Toxicol. In Vitro* 44, 361 (2017).