

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022

Bc. Lenka Moravcová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Porovnání kožních modelů pro testování kožní penetrace  
Diplomová práce

2022

Bc. Lenka Moravcová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Moravcová**  
Osobní číslo: **C20542**  
Studijní program: **N0711A130013 Chemické a procesní inženýrství**  
Specializace: **Ochrana životního prostředí**  
Téma práce: **Porovnání kožních modelů pro testování kožní penetrace**  
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

## Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši na téma in vitro test kožní penetrace se zaměřením na použití validovaných metod HPLC pro ověření průniku látek kožními modely (lidská kůže, komerční prasečí kůže, kůže z ušních boltců prasat a membrána Strat-M) za definovaných podmínek testu.
2. Ověřte provedením testu absorpce na uvedených kožních modelech průnik kyseliny benzoové do akceptorové kapaliny.
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte, proveďte jejich diskusi a porovnejte výhody a nevýhody použitých kožních modelů.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultanti diplomové práce: **Dr. Ing. Zora Nývltová**  
VÚOS  
**Ing. Jana Volková**  
VÚOS

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Porovnání kožních modelů pro testování kožní penetrace jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 21. 4. 2022

Bc. Lenka Moravcová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr. za vedení diplomové práce, podporu a užitečné rady. Dále děkuji též za vedení práce, užitečné rady, podporu a vstřícnost Ing. Zoře Nývltové, Dr. a Ing. Janě Volkové z VUOSU. Také bych chtěla poděkovat MUDr. Lence Kotingové, Ph.D., která mi dala užitečné rady do začátku diplomové práce. V poslední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá *in vitro* testováním kožní penetrace. Při testování byla sledována kvantitativní absorpce kyseliny benzoové za použití různých modelů kůže. Mezi použité kožní modely patřily komerční prasečí kůže, kůže z ušních boltců, lidská kůže nebo syntetické membrány za definovaných podmínek. Při testování byly využívány vertikální statické difuzní cely dle France. Analýza odebraných vzorků byla prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*in vitro*, transdermální absorpce, kůže, kyselina benzoová, difuzní cely, OECD, HPLC

## **TITTLE**

Comparison of skin models for skin penetration testing

## **ANNOTATION**

The diploma thesis deals with *in vitro* skin penetration testing. Quantitative absorption of benzoic acid was monitored during testing using various skin models. The skin models used included commercial pig skins, auricle skins, human skins, or the use of synthetic membranes under defined conditions. Vertical static diffusion cells according to France were used for testing. Analysis of the samples taken was performed by high performance liquid chromatography (HPLC).

## **KEYWORDS**

*in vitro*, transdermal absorption, skin, benzoic acid, diffusion cells, OECD, HPLC

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM GRAFŮ .....	14
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	15
ÚVOD .....	16
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	18
1.1 Metoda <i>in vitro</i> .....	18
1.2 Směrnice OECD .....	19
1.3 Transdermální absorpce .....	19
1.4 Kožní modely .....	21
1.4.1 Lidská kůže .....	22
1.4.1.1 Pokožka (epidermis) .....	22
1.4.1.1.1 Stratum corneum .....	22
1.4.1.2 Škára (dermis) .....	22
1.4.1.3 Podkožní vazivo (Subcutis) .....	23
1.4.2 Prasečí kůže .....	23
1.4.3 Membrány Strat-M .....	24
1.4.4 Skladování a příprava kožních modelů .....	25
1.5 Difuzní cely a jejich využití .....	26
1.5.1 Receptorová kapalina .....	27
1.6 Faktory ovlivňující absorpci testovaných látek kůži .....	28
1.6.1 Výběr a integrita modelu kůže .....	28
1.6.2 Aplikace na kůži .....	28
1.6.3 Vehikulum s testovanou látkou .....	29
1.6.4 Okluze .....	29
1.6.5 Teplota .....	29



1.6.6	Míchání receptorové kapaliny .....	30
1.6.7	Vzorkování .....	30
1.7	Referenční chemikálie .....	30
1.7.1	Kyselina benzoová .....	30
1.8	Vyhodnocení a zpracování výsledků .....	31
1.9	Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	33
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	35
2.1	Použité přístroje a vybavení .....	35
2.1.1	Kapalinový chromatograf .....	35
2.1.2	Vyhřívavý blok .....	35
2.1.3	Vertikální šroubovací difuzní cely .....	36
2.1.4	Ultrazvuk .....	38
2.1.5	Raznice .....	39
2.1.6	Injekční stříkačky .....	39
2.1.7	Analytické váhy .....	40
2.1.8	Ruční krimpovací kleště .....	40
2.1.9	Přístroj na přípravu ultračisté vody (UPW) .....	40
2.2	Použité chemikálie .....	41
2.3	Příprava roztoků .....	41
2.3.1	Příprava mobilní fáze A (MFA) .....	41
2.3.2	Příprava mobilní fáze B (MFB) .....	41
2.3.3	Příprava fyziologického roztoku (FR) .....	41
2.3.4	Příprava roztoku kyseliny benzoové (c=4 g/l) .....	41
2.3.5	Příprava standardů pro kalibrační křivku .....	42
2.3.6	Příprava roztoků kyseliny benzoové pro zjištění její stability .....	42
2.4	Použité kožní modely .....	43
2.4.1	Prasečí kůže z ušních boltců .....	43

2.4.2 Komerční prasečí kůže.....	43
2.4.3 Lidská kůže.....	44
2.4.4 M-Strat membrány.....	44
2.4.5 Prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete.....	44
2.5 Testování kožní penetrace.....	45
2.5.1 Příprava kožních modelů před testem.....	45
2.5.1.1 Příprava prasečí kůže z ušních boltců.....	45
2.5.1.2 Příprava prasečí kůže.....	46
2.5.1.3 Příprava lidské kůže.....	46
2.5.1.4 Příprava Strat-M membrány.....	46
2.5.1.5 Příprava prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete.....	46
2.5.2 Příprava šroubovacích difuzních cel.....	47
2.5.3 Příprava před testováním.....	48
2.5.4 Průběh testování.....	48
2.5.4.1 Průběh testování prasečích kůží z ušních boltců.....	49
2.5.4.2 Průběh testování komerčních prasečích kůží.....	50
2.5.4.3 Průběh testování lidské kůže.....	52
2.5.4.4 Průběh testování Strat-M membránou.....	53
2.5.4.5 Průběh testování prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete.....	54
2.6 Analýza vzorků.....	55
2.7 Vyhodnocení výsledků.....	55
3 VÝSLEDKY.....	56
3.1 Chromatografický záznam kyseliny benzoové.....	56
3.2 Kalibrační křivka.....	56
3.3 Stabilita roztoků.....	58
3.4 Prasečí kůže z ušních boltců.....	59
3.5 Komerční prasečí kůže.....	61

3.6 Lidská kůže .....	63
3.7 Strat-M membrána .....	64
3.8 Prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete .....	65
4 DISKUZE .....	66
5 ZÁVĚR .....	70
6 POUŽITÁ LITERATURA .....	72
7 PŘÍLOHY .....	77

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 – Zjednodušené znázornění průniků chemických látek kůže [17].....	20
Obrázek 2 – Model lidské kůže [27].....	23
Obrázek 3 – Model membrány Strat-M [31] .....	24
Obrázek 4 – Statická vertikální difuzní cela [37] .....	27
Obrázek 5 – Průběh absorpce s konečnou dávkou [47].....	32
Obrázek 6 – Schéma kapalinového chromatografu [52] .....	34
Obrázek 7 – Vysokotlaký kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2 .....	35
Obrázek 8 – Vyhřívaný blok od firmy Copley Scientific .....	36
Obrázek 9 – Vertikální difuzní cela od firmy Copley Scientific.....	37
Obrázek 10 – Rozměry vertikální difuzní cely od společnosti Copley Scientific .....	38
Obrázek 11 – Ultrazvuk Bendelin Sonorex RK540.....	38
Obrázek 12 – Raznice .....	39
Obrázek 13 – Injekční stříkačky Injekt – F od firmy B BRAUN .....	39
Obrázek 14 – Analytické váhy Mettler – Tolledo XS205DU .....	40
Obrázek 15 – Ruční krimpovací kleště.....	40
Obrázek 16 – Prasečí uši z domácího prasete.....	44
Obrázek 17 – Prasečí ucho po odříznutí kůže skalpelem .....	46
Obrázek 18 – Odříznutá část kůže z prasečího ucha .....	46
Obrázek 19 – Modely prasečí kůže domácího prasete .....	47
Obrázek 20 – Komerční prasečí kůže před testováním kožní penetrace .....	50
Obrázek 21 – Komerční prasečí kůže po testování kožní penetrace .....	51
Obrázek 22 – Lidské kůže po testování kožní penetrace.....	52
Obrázek 23 – Strat-M membrány po testování umístěné ve šroubení difuzní cely .....	53
Obrázek 24 – Chromatografický záznam kyseliny benzoové o c=5,37 mg/l .....	56

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Rozměry šroubovací cely Copley Scientific .....	38
Tabulka 2 – Příprava roztoků pro kalibrační křivku 0,01-100 mg/l .....	42
Tabulka 3 – Tloušťky komerčních kůží .....	43
Tabulka 4 – Tloušťky komerčních kůží .....	43
Tabulka 5 – Popis lidských kůží .....	44
Tabulka 6 – Parametry při testování kožní penetrace .....	45
Tabulka 7 – Podmínky při analýze vzorků .....	55
Tabulka 8 – Koncentrace standardů a jejich plochy .....	57
Tabulka 9 – Závislost plochy píku kyseliny benzoové na čase ( $c=1,033$ mg/l) .....	58
Tabulka 10 – Závislost plochy píku kyseliny benzoové na čase ( $c=5,165$ mg/l) .....	58
Tabulka 11 – Závislost plochy píku kyseliny benzoové na čase ( $c=10,33$ mg/l).....	58
Tabulka 12 – Hodnoty penetrace (prasečí tenká kůže) .....	59
Tabulka 13 – Hodnoty penetrace (prasečí silné kůže) .....	60
Tabulka 14 – Hodnoty penetrace (komerční prasečí kůže 1).....	61
Tabulka 15 – Hodnoty penetrace (komerční prasečí kůže 2).....	62
Tabulka 16 – Hodnoty penetrace (lidská kůže).....	63
Tabulka 17 – Hodnoty penetrace (Strat-M membrány) .....	64
Tabulka 18 – Hodnoty penetrace (prasečí kůže z domácího prasete).....	65
Tabulka 19 – Celkový souhrn výsledků testování .....	66
Tabulka 20 – Porovnání hodnot lidské kůže s publikací van de Sandt a kol. [53] .....	68
Tabulka 21 – Porovnání hodnot Strat-M membrán s diplomovou prací Bc. Bíškové [28] .....	68

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Kalibrační křivka kyseliny benzoové .....	57
Graf 2 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (prasečí tenká kůže) .....	59
Graf 3 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (prasečí silné kůže) .....	60
Graf 4 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (komerční prasečí kůže1) .....	61
Graf 5 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (komerční prasečí kůže 2) .....	62
Graf 6 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (lidská kůže) .....	63
Graf 7 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (Strat-M membrány) .....	64
Graf 8 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (prasečí kůže z domácího prasete)....	65

## **SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK**

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development (Organizace pro hospodářskou spolupráci)

SC – Stratum corneum

UV záření – Ultraviolet (Ultrafialové záření)

ECETOC – European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (Evropské centrum pro ekotoxikologii a toxikologii chemikálií)

SCCS – Scientific Committee on Consumer Safety (Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitelů)

PES – Polyethersulfon

RPMI – Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (růstové médium používané v buněčné kultuře)

ER – Elektrický odpor

TEWL – Transepidermal water loss (Transepidermální ztráta vody)

TWF – Tritiated Water Flux (Tok tritiované vody)

MF – Mobilní fáze

HPLC – High performance liquid chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)

DAD – Diod array detector (detektor diodového pole)

SD – Směrodatná odchylka

RSD – Relativní směrodatná odchylka

## ÚVOD

Toxikologie v průběhu posledního století prošla velkým vývojem, kdy se pro výzkumy začalo využívat kromě celých organismů, také jejich alternativnější způsoby nazývané jako *in vitro*. *In vitro* metody využívající tkáňové a buněčné kultury se staly významným nástrojem pro pochopení implikace expozic exogenních látek a pro hodnocení rizik chemických látek. Používání chemicky definovaných kultivačních médií s následnou dostupností lidských buněk proměnila nové technologie metod *in vitro* na hodnotný nástroj vědeckého výzkumu.

V testech *in vitro* se využívají pouze části organismů. Doslovný překlad *in vitro* znamená „ve zkumavce“, nebo „ve skle“. Na rozdíl od metod *in vivo*, kde se používají celá zvířata, je metoda *in vitro* z hlediska etiky přijatelnější.

Lidské tělo je po celou dobu svého života vystaveno chemickým látkám, které mohou být absorbovány kůží, což může mít vliv na lidské zdraví. Ať už se jedná o plynné, pevné či kapalné látky, je nutné znát jejich vliv na lidské zdraví při jejich expozici. Metody *in vitro* se proto nejvíce uplatňují v odvětví agrochemického a farmaceutického průmyslu, biocidů, zdravotnictví a kosmetiky.

Pro regulaci a specifikaci testování chemických látek metodou *in vitro* slouží směrnice vytvořené Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD). Tyto směrnice popisují metody, které slouží pro hodnocení dermální absorpce testované látky kůží.

Metody *in vitro* využívají při testování dermální absorpce difuzní cely. Difuzní cely mohou být statické (Franzovy cely), nebo průtočné. Průtočné cely více napodobují krevní oběh živého organismu nežli cely statické. Cely jsou složeny ze dvou částí – donorové a receptorové. Mezi obě tyto části se vkládá model kůže, na který se aplikuje v určitém objemu testovaná látka.

Nejvhodnějším kožním modelem pro metody *in vitro* je lidská kůže. Avšak možnosti získávání lidské kůže jsou velmi omezené, jelikož je podřízena mezinárodním a národním etickým úvahám. Alternativní náhradou za lidskou kůži jsou kůže zvířecí. Mezi nejčastěji používané zvířecí modely kůže patří prasečí nebo potkaní kůže. Z hlediska morfologických vlastností je lidské kůži nejpodobnější právě prasečí kůže. Místo lidské a zvířecí kůže je možno využít syntetické membrány, které simulují lidskou kůži.

Při samotném testování *in vitro* je důležité zohlednit některé faktory, které mohou ovlivnit absorpci testované látky kůží. Mezi tyto faktory patří teplota receptorové kapaliny a kůže,



způsob aplikace testované dávky, způsob a frekvence vzorkování, míchání a složení receptorové kapaliny, použití okluze, rozpustnost testované látky v donorové a receptorové kapalině a vhodný výběr kožního modelu.

Účelem studií dermální absorpce testovaných látek je zjištění kvantitativních a kvalitativních informací o množství testované látky, která vstoupila do tělního objemu skrze kůži. Pro vyhodnocení absorbovaného množství testované látky je využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie [1 - 4].

Testování kožní penetrace bylo provedeno, podle již validované metody, kterou provedla ve své diplomové práci s názvem *In vitro* kožní penetrace – vývoj testovací metody Bc. Lucie Bíšková.

Cílem diplomové práce bylo porovnat průběhy penetrace testované látky kyseliny benzoové do receptorové kapaliny za použití různých typů kožních modelů. Mezi použité kožní modely patřily prasečí kůže z ušních boltců, komerční prasečí kůže, lidské kůže nebo použití syntetických membrán za přesně definovaných podmínek. Tyto podmínky byly pro všechny testování stejné. Při testování kožní penetrace byly využívány vertikální statické difuzní cely dle France se šroubením. Analýza vzorků byla prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Metoda *in vitro*

Metoda *in vitro* je důležité a aktuální téma v oblasti hodnocení a klasifikace chemické bezpečnosti. Přesný překlad *in vitro* znamená „ve zkumavce“. Doslovný překlad je latinský a znamená „ve skle“. Jedná se o alternativní metodu, u které se nepoužívají živá zvířata [1].

Testování absorpce kůží *in vitro* je alternativní metodou uznávanou právními předpisy (Směrnice OECD 428). Navzdory významným úspěchům v hodnocení rizik chemických látek zůstává toxikologická databáze, zejména pro průmyslové chemikálie, omezená. Vzhledem k tomu, že je na trhu přibližně 80 000 chemikálií a extrémně velký počet chemických směsí, je testování tohoto velkého množství metodou *in vivo* z ekonomického i praktického hlediska nedosažitelné. Metoda *in vivo* využívá k testování celá zvířata na rozdíl od metody *in vitro*. I přesto, že metody *in vitro* jsou schopny rychle poskytnout informace o toxicitě, regulační orgány jsou obecně stále opatrné, pokud jde o nahrazování metod zaměřených na celé zvíře novými technikami *in vitro* [2] [3].

Metody *in vitro* jsou široce a běžně používané pro klasifikaci a prověření chemikálií a pro formování celkových toxikologických profilů. Slouží tedy pro kvalitnější pochopení nebezpečných vlastností chemických látek a pro predikci vlivů a účinků na člověka [4].

V testech *in vitro* se používají výhradně části organismů, a to buď jako samostatné buňky, tak i jako tkáně složené z různorodých typů buněk. Ačkoliv jsou buňky používané v metodě *in vitro* získané usmrcením živého organismu, tak pro tuto metodu se používají humánnější způsoby. Například z jednoho usmrceného organismu se využijí živé buňky pro několik testů *in vitro*, oproti metodě *in vivo*, kdy se usmrcuje jeden či více živých organismů pro jedno testování [4] [5].

*In vitro* testy se časově pohybují v řádech minut až hodin, což je nesrovnatelně méně než v testování *in vivo*. *In vitro* umožňuje testování mnoha vzorků za krátkou dobu a řadu z nich lze miniaturizovat a automatizovat [4] [6].

## 1.2 Směrnice OECD

Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) vytváří mezinárodně uznávané směrnice, které uvádějí specifikace pro testování chemických látek. Tyto zkušební směrnice OECD jsou neustále přezkoumávány, přičemž směrnice jsou pravidelně aktualizovány a jsou přijímány nové.

Lidské zdraví je ohroženo vystavením chemickým látkám s jejich následnou absorpcí kůží. Za účelem standardizace prediktivního testování dermální absorpce pro regulační účely přijala OECD směrnici 428, která popisuje metody pro hodnocení absorpce pomocí lidské a zvířecí kůže. Testovací směrnice OECD 428 je používána již více než deset let pro hodnocení dermální absorpce [7] [8].

Stávající předpisy pro chemikálie a spotřební výrobky používají pro dermální penetraci specifické průmyslové protokoly. Většinou tyto pokyny předpokládají, že produkt přijde do kontaktu s neporušenou a zdravou lidskou pokožkou. Existují však aplikace produktů, které začleňují potenciálně narušenou pokožku, jelikož průmyslové produkty mohou také být používány jednotlivci s narušenou pokožkou.

Testovací směrnice OECD 428 pro hodnocení dermální absorpce *in vitro* také vyžaduje, aby byla dermální absorpce kvalifikována zahrnutím distribuce hmotnostní bilance sledované sloučeniny [8 - 11].

## 1.3 Transdermální absorpce

Transdermální neboli perkutánní/dermální absorpce je proces, který popisuje přestup látek přes kůži do tělního oběhu. Tento proces se dá rozdělit do tří kroků, a to:

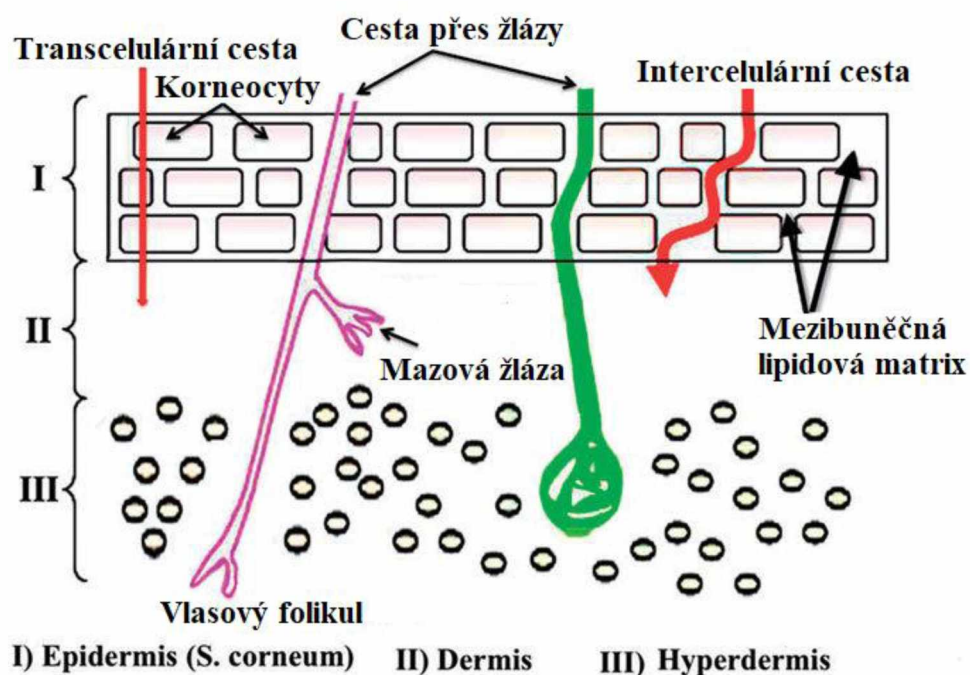
- Penetrace – proces, kdy látka vstupuje do určité vrstvy či struktury (např. vstup látky do stratum corneum).
- Permeace – proces, kdy látka proniká přes jednu vrstvu do druhé.
- Resorpce – proces, kdy je látka přijímána do cévního systému a následně do tělního oběhu.

Absorbovaná dávka je definovaná jako množství látky absorbované do receptorové kapaliny nebo systémové cirkulace, a to během stanoveného časového období. Zatímco absorbovatelná dávka je množství testované látky v kůži a na kůži po promývání. Chemické látky se dostávají

do vnitřního prostředí organismu pěti způsoby:

- Transcelulární cestou
- Intercelulární cestou
- Vlasovými folikuly
- Mazovými žlázami
- Vývody potních žláz

Na obrázku 1 je zjednodušené schéma znázornění průniků chemických látek kůží. Pronikání chemických látek závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech kůže a její chemické struktře. Většinou se uplatňují intercelulární cesty, a to především u látek lipofilní povahy. V menší míře se uplatňují transcelulární cesty, a to zejména u látek hydrofilní povahy. Transcelulární cesty jsou nevýhodné díky obtížnější cestě, jelikož látka musí přecházet nejen přes mezibuněčný lipidový matrix (hydrofobní), ale také přes hydrofilní vnitřní prostředí buněk. V nejmenší míře se uplatňují cesty mazovými a potními žlázami, které nemají velký vliv na dermální absorpci [5] [12 - 16].



**Obrázek 1** – Zjednodušené znázornění průniků chemických látek kůží [17]

Účelem studie dermální absorpce chemických látek je zjistit kvantitativní a kvalitativní informace o množství, které vstoupilo do tělního oběhu. Pronikání chemických látek kůží dermální cestou je součástí hodnocení rizik pro lidské zdraví. Rychlost absorpce chemických látek kůží je ovlivněna několika faktory, mezi něž patří zdravotní stav kůže, rasa, věk, anatomická oblast a formulace kůže. Chemikálie musí projít intercelulárními lipidy stratum corneum (SC), které obklopují mrtvé korneocyty, a následně podkožním tukem do krevních kapilár [11] [13] [14] [18].

Mezi modely používané pro metody *in vitro* patří lidská kůže, zvířecí kůže a syntetické membrány. Pro testování *in vitro* metodou, kde se hodnotí dermální penetrace lokálně aplikovaných chemikálií, je vždy zapotřebí neporušené kůže. Je tomu tak z toho důvodu, že narušené SC nejspíše neposkytuje dobrou bariéru pro vniknutí exogenních látek. Například kůže, která je narušena v důsledku podráždění, kožního onemocnění nebo senzibilizace bude nepochybně méně účinnou bariérou pro vstup chemických látek do systémové cirkulace dermální cestou [19] [20].

Mezi běžné parametry používané v oblasti dermální absorpce se řadí absorpce chemických látek kůží do receptorové kapaliny, mnohdy představována jako rychlost absorpce nebo tok kůží (Flux). Modely kůže *in vitro*, které se používají při hodnocení rizik a které se řídí směnicí OECD 428, vyžadují i rozložení hmotnostní bilance aplikované dávky chemické látky [9].

## 1.4 Kožní modely

Výběr kůže závisí na několika faktorech. V první řadě závisí na účelu testu a na dostupnosti vzorků kůže. Pro hodnocení rizika lidského zdraví je nejvhodnější lidská kůže. Lidská kůže poskytuje vhodnější a přesnější údaje. Možnosti opatření lidské kůže jsou omezené, jelikož je podřízena mezinárodním a národním etickým úvahám (ECETOC, 1993). Nejčastěji se používají ženské prsní nebo břišní kůže opatřené z kosmetické chirurgie, nebo z pitvy.

Místo lidské kůže mohou být použity kůže ze zvířat. Používají se prasečí nebo potkaní kůže. Potkaní kůže se nejčastěji používají v toxikologických studiích *in vivo*. Schopnosti absorpce lidské kůže bývají nižší nežli u potkaní kůže, kde je propustnost kůže vyšší. Častěji se proto využívá prasečí kůže, která je lidské kůži morfologicky podobnější.

Pro testování penetrace je nejvhodnější použití čerstvé kůže. Čerstvá kůže má aktivní enzymatický systém, a díky tomu je možno tuto kůži použít nejenom k testování průniku

chemických látek, ale také k testování dermálního metabolismu [16] [21] [22].

#### **1.4.1 Lidská kůže**

Lidská kůže je největší orgán v těle s povrchem cca 1,8 m<sup>2</sup>. Tloušťka kůže je v rozmezí od 0,5 do 4 mm, přičemž nejsilnější vrstva je na zádech a nejtenčí je na očních víčkách. Lidská kůže funguje jako první ochranná bariéra těla. Mezi funkce kůže patří regulace prostupu vody a elektrolytů, ochrana proti záření, nejčastěji UV záření a ochrana proti mikroorganismům. Proti UV záření chrání tělo melanin, který je produkován melanocyty a distribuovaný do keratinocytů. Hmotnost kůže se pohybuje kolem 3 kg, přičemž s tukovou tkání může mít až 20 kg. Kůže je heterogenní orgán, který obsahuje několik vrstev. Kůže má dvě hlavní vrstvy a podkožní vazivo. Vrchní vrstvou je epidermis a vnitřní vrstvou je dermis, která je silnější než epidermis.

##### **1.4.1.1 Pokožka (epidermis)**

Pokožka neboli epidermis je tvořena vrstvami buněk, které jsou uloženy ve vrstvách v těsné blízkosti nad sebou. V hlubších vrstvách jsou nervová zakončení, která slouží ke vnímání bolesti. Náhrada poškozené vrstvy kůže je závislá na kmenových buňkách epidermis. Tyto buňky mají schopnost se dělit a tím umožňovat generaci nových buněk. Hranice mezi pokožkou a škárou je ostrá.

###### **1.4.1.1.1 Stratum corneum**

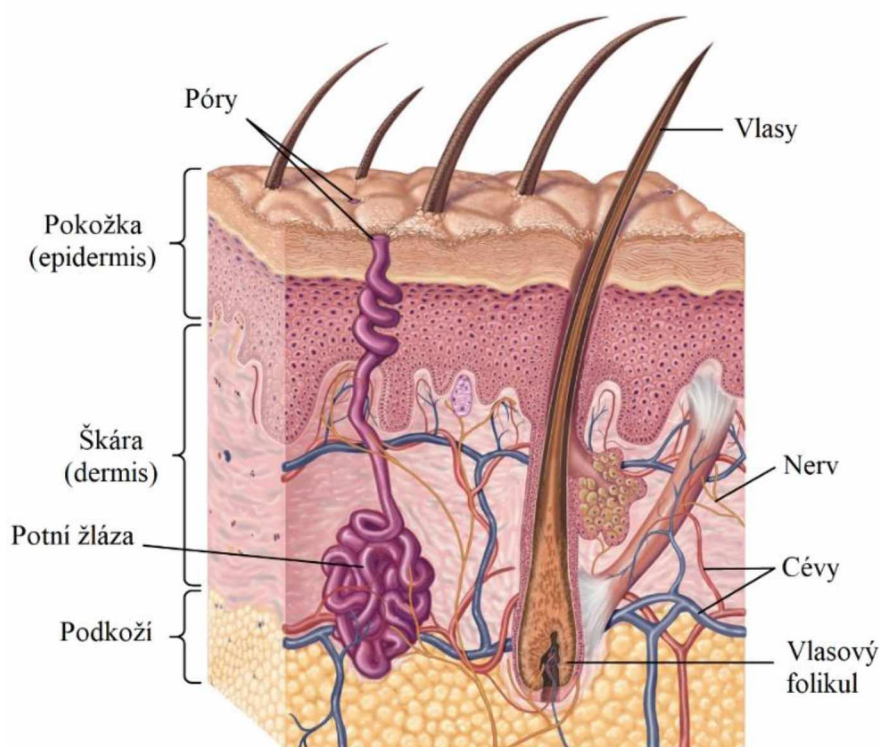
Mezi vnější vrstvy patří SC, která slouží jako bariéra pro exogenní sloučeniny, případně omezuje pronikání exogenních sloučenin. Její tloušťka SC může dosahovat od 10-15 μm, ale při hydrataci SC se tloušťka zvětšuje a může dosahovat až 40 μm. Buňky stratum corneum jsou nazývány jako korneocyty. V podstatě se jedná o mrtvé buňky bohaté na keratin. Pro napodobení SC byly doporučeny různorodé modely. Základní a jednoduchý model je definován jako stavba „z cihel a malty“, kdy SC zahrnuje korneocyty jako cihly a mezibuněčný lipidový matrix jako maltu, který je zodpovědný za bariérovou funkci. Intracelulární lipid je složen ze směsi cholesterolu, esterů cholesterolu, mastných kyselin a ceramidů [15] [23 - 26].

##### **1.4.1.2 Škára (dermis)**

Škára obsahuje vazivo, ve kterém se nachází mazové a potní žlázy, vlasové folikuly, volná nervová zakončení, pojivá tkáň a lymfatické cévy. Dermis má funkci ochrany před exogenními látkami, a dále napomáhá rozvíjet strukturu pokožky, jelikož obsahuje elastin a kolagen.

### 1.4.1.3 Podkožní vazivo (Subcutis)

Podkožní vazivo, které se nachází pod vrstvou dermis, slouží jako izolant a udržuje teplotu těla. Tato vrstva připevňuje kůži ke svalům a tkáni pod ní. Podkožní vazivo je tvořeno elastickými a kolagenními vlákny, mezi nimiž jsou rozptýleny tukové buňky [26]. Na obrázku 2 je model lidské kůže.



**Obrázek 2** – Model lidské kůže [27]

### 1.4.2 Prasečí kůže

Prasečí kůže je vhodným a prediktivním modelem pro penetraci látek lidskou kůží. Prasečí kůže má velmi podobné propustné a morfologické vlastnosti jako kůže lidská. Používání prasečí kůže je rovněž povoleno v regulačních studiích pro dermální penetraci kosmetických přísad (SCCS, 2010). Další výhodou prasečí kůže je skutečnost, že je dostupnější než lidská kůže, přičemž je doporučováno upřednostňovat jateční odpad, který je vedlejším produktem při výrobě potravin, před laboratorními zvířaty [9].

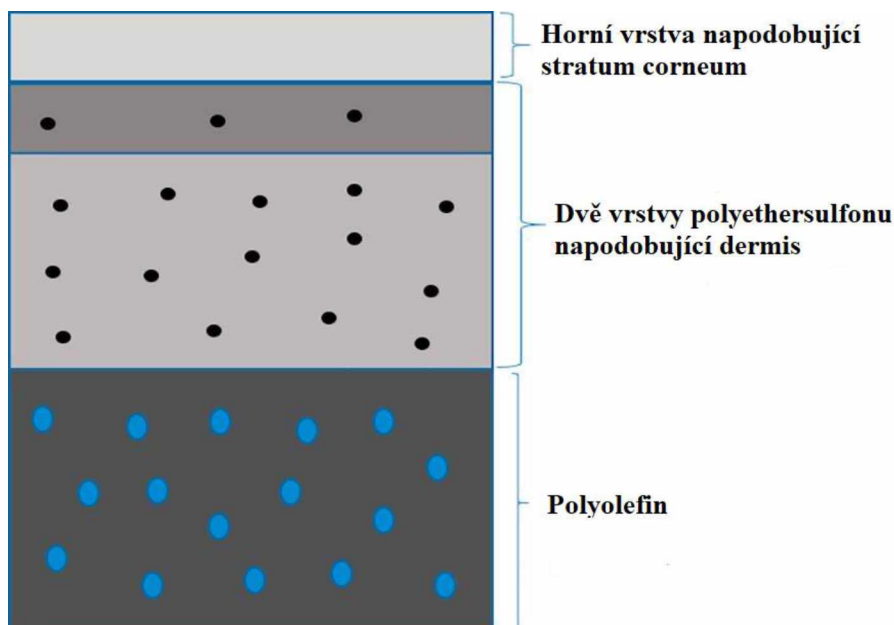
Nejčastěji se prasečí kůže odebírá z břicha, boků a zad. Často se pro dermální absorpci využívá

kůže z ušních boltců, která má velmi podobnou anatomickou stavbu jako lidská kůže. Je tu i možnost použití kůže z novorozenečích selat, které mají tenčí kůži, avšak její nevýhodou je vyšší obsah vlasových folikul [5].

### 1.4.3 Membrány Strat-M

Difuzní studie Franzova typu často zahrnují použití syntetických membrán k modelování skutečné kůže. Membrána Strat-M je komerčně dostupná polymerní membrána napodobující lidskou kůži. Díky využívání membrány Strat-M, lze nahradit používání lidských a zvířecích kůží. Jedná se o syntetickou polymerní membránu, která se skládá z několika vrstev polyethersulfonu (PES), vnitřní části polyolefinové vrstvy vytvářející hydrofobní a hydrofilní domény podobné těm, které má lidská kůže. Vrchní vrstva představuje SC. Membrána Strat-M je schopna předvídat difuzi v lidské kůži pro širokou škálu chemických látek. Na obrázku 3 je znázorněn model membrány Strat-M.

Tyto syntetické membrány jsou předem nařezané disky, které jsou vždy jednotlivě zabaleny. Výrobce těchto membrán udává, že není třeba tyto membrány před použitím hydratovat [16] [28 - 31].



Obrázek 3 – Model membrány Strat-M [31]



#### 1.4.4 Skladování a příprava kožních modelů

Nejčastěji se kůže skladuje formou mražení, případně je možné některé zvířecí kůže použít ihned. Během skladování může docházet ke změnám ve vlastnostech kůže, tudíž je nutné dodržovat určité podmínky při jejím skladování. Například ve studii bylo prokázáno, že zmražená králíčí kůže, měla horší propustnost pro estradiol než čerstvá králíčí kůže. Je proto důležité, aby každá laboratoř zapisovala podmínky skladování a přípravy kůže [32].

Životnost vzorku kůže je měřená jako metabolická aktivita. Metabolická aktivita je definována jako úroveň přeměny glukosy na laktát. Tato metabolická aktivita klesá s dobou skladování [16].

Kůže se uchovávají při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 3 týdnů, a to buď s použitím, nebo bez použití polyethylenglykolu, případně se mohou uchovávat při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Podle mezinárodního programu chemické bezpečnosti je možno lidskou kůži uchovávat při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do 1 roku. Bylo zjištěno, že zmražení kůže je vhodné pro měření pasivní permeace chemických látek při studiích, které se nezabývají životaschopností a metabolismem. Před použitím pro *in vitro* je nutno kůži rozmrazit, za dodržení určitých podmínek [28] [33] [36].

Poslední možností pro skladování kůže je její usušení. Při sušení kůže dochází k menšímu anatomickému poškození, než tomu bývá u zmražení kůže. Před použitím je nutno tuto usušenou kůži hydratovat. Tento způsob skladování se používá nejméně [16].

K samotné přípravě kožních modelů lze použít několik metod. První metodou je způsob, kdy se odstraní z kůže spodní vrstva dermis. Tímto způsobem se získá dermatovaná kůže jednotného tvaru a tloušťky se SC a epidermis. Získá se tak kůže o tloušťce v rozmezí 0,3 – 0,8 mm. Vzorky kůže jsou následně oříznuty tak, aby se vešly do difuzních cel.

Další způsob přípravy kožních modelů je získání pouze epidermální vrstvy, kdy se odstraní vrstva epidermis od dermis pomocí tepelné separace. Kůže je ponořena do vody o teplotě  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 1-2 min s následným odlupováním dermis. Touto metodou je zničena metabolická životaschopnost kůže, ale i přesto je tento způsob podporován regulačními a poradenskými agenturami. Poslední způsob přípravy kůže je získání pouze samotného SC [11] [34].

## 1.5 Difuzní cely a jejich využití

Difuzní cely jsou nejčastěji vyrobeny z borosilikátového skla. Materiál těchto cel musí být inertní a neabsorbující, aby neovlivňoval samotné testování *in vitro*. Při špatně zvoleném materiálu cel by mohl reagovat s testovanou látkou, případně by mohlo docházet k její absorpci či adsorpci na povrchu těchto cel. Mezi další materiály patří teflon. Jedná se tedy o takzvané komůrky, které se skládají ze dvou částí. Horní část je označována jako donorová část a dolní část je nazývána jako receptorová část.

Difuzní cely se vyrábějí v několika velikostech. U difuzních cel s menším objemem receptorové části je výhoda menšího ředění testované látky, a tím lepší analytické detekce. V některých případech je upřednostňován větší objem receptorové části [11] [35].

Cely se mohou dělit podle přivádění receptorové tekutiny na:

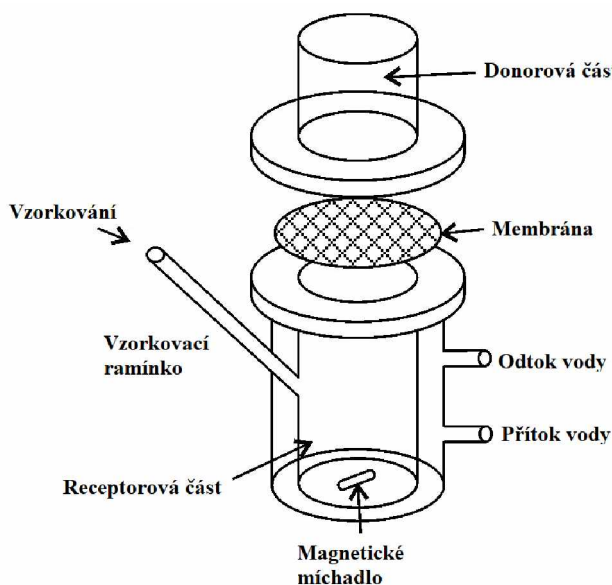
- Statické cely
- Průtočné cely

Statické cely nazývané též jako Franzovy cely byly navrženy v roce 1975. Tyto cely se mohou dále dělit podle uspořádání na vertikální a horizontální cely. Častěji se využívají vertikální Franzovy cely. Mezi donorovou a receptorovou část se vkládá membrána/kůže. Kůže mezi oběma částmi je upevněna pomocí klemy, nebo pomocí šroubení. U Franzových cel se receptorová část plní receptorovou tekutinou, do které difunduje aplikovaná látka skrz membránu. Receptorová kapalina musí být v kontaktu s membránou/kůží, aby mohlo docházet k absorpci testované látky do receptorové kapaliny.

V receptorové části je umístěno magnetické míchadlo pro lepší cirkulaci a tím zajištění rovnoměrných koncentrací testované látky v celém objemu receptorové kapaliny. Pro lepší absorpci testované látky je receptorová kapalina temperována na konstantní teplotu. Teplota receptorové tekutiny by měla být co nejpodobnější teplotě lidského těla. Pro vyhřívání cel se používají tzv. termobloky. Metodika OECD doporučuje udržovat teplotu lidské kůže na  $32 \pm 1$  °C.

Odběr vzorku se provádí manuálně přes vzorkovací ramínka, za pomoci jehly. Vzorek se odebírá v určitých intervalech. Po odebrání vzorku se do receptorové části přidá čerstvá receptorová kapalina, aby hladina kapaliny dosahovala na vyznačenou rysku na ramínku.

U průtočných difuzních cel je receptorová kapalina kontinuálně nahrazována za čerstvou receptorovou kapalinu pomocí čerpadla. Tento způsob je vhodný především pro látky s nízkou rozpustností v receptorové kapalině. Tyto průtočné cely jsou oproti statickým celům finančně nákladnější, avšak lépe napodobují vnitřní prostředí organismu. Na obrázku 4 je znázorněna statická vertikální difuzní cela [11] [28] [36].



**Obrázek 4** – Statická vertikální difuzní cela [37]

### 1.5.1 Receptorová kapalina

Receptorová kapalina je definována jako fyziologicky vodivá kapalina. Volba receptorové kapaliny závisí na několika faktorech. Prvním faktorem je vlastnost použitého kožního modelu. Druhým faktorem pro volbu receptorové kapaliny je vlastnost testované látky. Úlohou receptorové kapaliny je napodobení mezibuněčné tekutiny v kůži, kdy receptorová kapalina by neměla ovlivňovat integritu kožního preparátu.

Podle směrnice OECD by měla být prokázána rozpustnost testované látky v použité receptorové kapalině a mělo by být známo přesné složení této kapaliny. Pokud by testovaná látka nebyla rozpustná v receptorové kapalině, mohlo by docházet k tzv. překážce pro absorpci. Za dostatečnou rozpustnost je považována rozpustnost, která je 10 krát vyšší, než je odhadovaná maximální koncentrace testované látky v receptorové kapalině.

Některé receptorové kapaliny podporují životaschopnost kůže během testování. Tyto kapaliny obsahují kultivační médium jako RPMI, které je schopno pokožku udržet metabolicky aktivní

po dobu více než 24 hodin. Dále se využívá Ringerův roztok, který obsahuje několik druhů solí a iontů [5] [11] [38].

## **1.6 Faktory ovlivňující absorpci testovaných látek kůží**

Mezi faktory ovlivňující penetraci testovaných látek patří výběr modelu kůže, způsob dávkování a vzorkování, použití okluze, teplota kůže a receptorové kapaliny, rychlost míchání receptorové kapaliny a složení vehikula, ve kterém je testovaná látka rozpuštěna.

### **1.6.1 Výběr a integrita modelu kůže**

Testování je velmi závislé na volbě použitého modelu kůže. Nejvhodnější volba je lidská kůže, která nám poskytuje nejpřesnější informace o absorpci látky u lidí. Pro testování penetrace látek je nejvhodnější použití čerstvé kůže. Na vliv absorpce látek má vliv stáří a tloušťka kůže, její skladování a zacházení při testování, případně poškození kůže.

Při metodě *in vitro* dermální penetrace se běžně používají testy integrity kůže. Tyto testy zahrnují měření elektrického odporu (ER), transepidermální ztráty vody (TEWL) a tritiovaného vodního toku (TWF). TEWL je metoda, která je neinvazivní a obdobný nástroj lze využít i pro hodnocení bariérové funkce *in vitro* a *in vivo*. Nevýhodou měření TEWL je skutečnost, že je zapotřebí stabilizované prostředí s ovládanou vlhkostí a teplotou kolem sondy. Měřením těchto parametrů lze zjistit, zda byla či nebyla porušena ochranná funkce kůže [5] [16] [19] [39].

### **1.6.2 Aplikace na kůži**

Podle směrnice OECD lze aplikaci dávky na povrch kůže rozdělit na dva způsoby:

- Konečná dávka
- Nekonečná dávka

U nekonečné dávky lze dosáhnout a zachovat maximální rychlost absorpce testované látky, narozdíl od konečné dávky, kde nelze zachovat maximální rychlost absorpce. Nekonečné a konečné dávkování je určeno permeačním chováním, nikoliv množstvím aplikované dávky.

Směrnice OECD doporučuje pro konečné dávkování  $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  nebo  $10 \text{mg}/\text{cm}^2$  množství aplikované dávky. Pokud je aplikované množství menší než  $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , tak dochází k nerovnoměrné distribuci na kůži. Pro předběžné experimenty je doporučeno tuto testovanou dávku zvýšit na objem  $30\text{-}100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ . Toto množství by mělo zajistit rovnoměrné rozložení aplikované dávky.

Pro testování s nekonečnou dávkou se doporučuje 100  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  aplikované dávky. Případné množství aplikované dávky musí být dostatečné, aby se zajistila téměř konstantní koncentrace během celého testu.

Pro aplikaci testované látky se doporučuje použít zařízení s přesně definovaným objemem, jako injekční stříkačky, přesné pipety či objemové pipety s vážením před a po nadávkovaném množství. Za normálních podmínek života, je člověk ve většině případů vystaven chemickým látkám s konečnou dávkou [11] [28] [38].

### **1.6.3 Vehikulum s testovanou látkou**

Při absorpci kůží hraje důležitou roli lipofilita a schopnost látek vázat vodíkové vazby. Některé složky vehikula jsou schopny ovlivnit penetraci chemických látek kůží. Může být ovlivněna bariérová schopnost kůže, nebo rozdělení sloučenin do SC. Proto penetrace látek závisí nejen na jejich vlastnostech, ale také na vlastnostech dalších přítomných složek v jejich formulaci. Vehikulum, ve kterém je rozpuštěna daná penetrační látka, může ovlivnit propustnost kůže několika mechanismy. Mezi ovlivněné mechanismy patří hydratace, fluidizace, narušení desmozomu ve stratum corneum, případně změna polarita. Čistá rozpouštědla mohou naopak přímým korozivním účinkem zvýšit propustnost kůže [11] [24].

### **1.6.4 Okluze**

Podle směrnice OECD se doporučuje vystavit chemické látky kůží bez okluze, jelikož to odpovídá reálným scénářům expozice na lidské tělo. Avšak v některých případech se bez okluze neobejdeme. Například je její použití vhodné při použití těkavých testovaných látek, které by místo absorpce mohly vytékat do ovzduší. Další možností, proč používat okluzi, je napodobení kontaminované kůže při používání ochranných rukavic.

Okluze je důležitým faktorem, při kterém je možno ovlivnit některé parametry a tím ovlivnit i prostup kůží. Patří sem teplota, transepidermální ztráta vody (TEWL), hydratace kůže a pH povrchu pokožky [5] [11] [28].

### **1.6.5 Teplota**

Volba teploty je důležitým faktorem při testování *in vitro*. Podle směrnice OECD je doporučováno, aby teplota kůže a difuzní komory byla po celou dobu testování konstantní, blízká teplotě kůže  $32 \pm 1$  °C. Vlhkost by se měla pohybovat mezi 30–70 %. Teplota krve v kůži se v přirozených podmínkách pohybuje kolem 33–35 °C. Zvyšováním teploty se usnadňuje prostup testovaných látek (hydrofilní a lipofilní) kůží [11].

### 1.6.6 Míchání receptorové kapaliny

Rychlost míchání receptorové kapaliny je velmi důležitý parametr při testování. Míchání ovlivňuje distribuci testované látky receptorové kapaliny. Při zvolené nízké rychlosti míchání je problém s distribucí testované látky v receptorové kapalině. Naopak při rychlém míchání receptorové kapaliny by mohl vzniknout vír. Tento vzniklý vír by rozrušoval hladinu receptorové kapaliny a tím by ovlivnil difuzi testované látky. Nejvhodnější je nejvyšší hodnota rychlosti míchání, kdy nevzniká ještě vír, ale dobře se rozmíchává testovaná látka v receptorové kapalině. Zvolená rychlost míchání je závislá na použité difuzní cele, především na velikosti a rozměru cely [11] [28].

### 1.6.7 Vzorkování

Důležitým faktorem pro testování *in vitro* je četnost odebírání vzorků. Díky tomuto parametru jsme schopni určit rychlost penetrace testované látky kůží. To znamená, že čím rychlejší je penetrace testované látky kůží, tím kratší jsou intervaly mezi odebíráním vzorků. Směrnice OECD doporučuje 6-12 odběrů vzorků během 24 hodin. Čím kratší je frekvence vzorkování, tím se získá přesnější křivka, která je schopna popsat profil kinetické absorpce. Doba prvního odběru je ve většině případů určena detekčním limitem analytické metody pro testovanou látku [11].

## 1.7 Referenční chemikálie

Pro zvýšení spolehlivosti výsledků metody *in vitro* bylo některými zeměmi dohodnuto používání určitých referenčních chemikálií. Mezi referenční chemikálie patří kyselina benzoová, testosteron a kofein s různými rozdělovacími koeficienty. Při testování referenčních chemikálií je doporučeno testovat za stejných podmínek, které jsou uvedeny ve směrnici OECD [40].

### 1.7.1 Kyselina benzoová

Kyselina benzoová se vzorcem  $C_6H_5COOH$  patří mezi nejjednodušší aromatické jednosytné karboxylové kyseliny. Jedná se o bezbarvou až bílou krystalickou látku, rozpustnou ve vodě s molární hmotností 122,12 g/mol. Teplota tání u kyseliny benzoové je 122,4 °C a teplota varu je 249 °C.

Kyselina benzoová a její soli se využívají ke konzervaci potravin díky fungicidním vlastnostem. Využívá se i v lékařství, a to v kombinaci s kyselinou salicylovou, při léčbě kožních infekcí. Kyselina benzoová se nachází i v některých kosmetických přípravcích, zubních pastách a deodorantech. V kosmetických přípravcích se kyselina benzoová a její soli používají

v maximální koncentraci 0,5 %. V přírodě se kyselina benzoová vyskytuje jak volně, tak i v pryskyřicích benzoe a ve formě esterů [41].

Redukčním produktem kyseliny benzoové je benzaldehyd se vzorcem  $C_6H_5CHO$ . Vyznačuje se charakteristickým zápachem po hořkých mandlích. Snadno prostupuje kůži i plícemi, a snadno se rozšiřuje v organismu. Benzaldehyd se v organismu nekumuluje, ale je metabolizován na kyselinu benzoovou a vyloučen močí [42] [43].

## 1.8 Vyhodnocení a zpracování výsledků

Po ukončení experimentu se část testované látky nachází na povrchu a ve vrstvách kůže, přičemž největší část testované látky se nachází v receptorové kapalině. Nejjednodušší způsob zjištění průběhu penetrace testované látky kůží je analýza receptorové kapaliny. Analýza jednotlivých vzorků receptorové kapaliny se nejčastěji provádí pomocí HPLC [16] [39].

Pomocí HPLC lze vyhodnotit kvantitu a kvalitu separované (testované) látky. K identifikaci separovaných látek slouží retenční čas. Retenční čas se získá z chromatografického záznamu. Množství (kvantita) separované látky se stanovuje plochou zaznamenaného píku nebo výškou píku. Pro kvantitativní stanovení lze použít několik metod, mezi které patří:

- Metoda vnějšího standardu (kalibrační křivka)
- Metoda přídavku standardu
- Metoda vnitřního standardu.

Mezi nejjednodušší způsoby patří metoda kalibrační křivky. Při metodě kalibrační křivky se analyzují roztoky standardů o různé, ale známé koncentraci testované látky. Při této metodě se získá lineární závislost plochy píku (výšky píku) na koncentraci testované látky, kterou lze vyjádřit graficky. Při vyšším počtu použitých kalibračních roztoků se získá přesnější závislost kalibrační přímky.

Ze získané kalibrační přímky lze odvodit vztah:  $x_i = a + bc_i$ , kde  $a$  značí úsek na ose  $y$ ,  $b$  je směrnice kalibrační přímky a  $x_i$  představuje hodnotu veličiny  $X$  pro koncentraci  $c_i$  [16] [39] [44 - 46].

Po zjištění kvantitativního množství (koncentrace) testované látky v receptorové kapalině lze pomocí odvozeného vztahu vypočítat parametr kumulativního množství z rovnice (1):

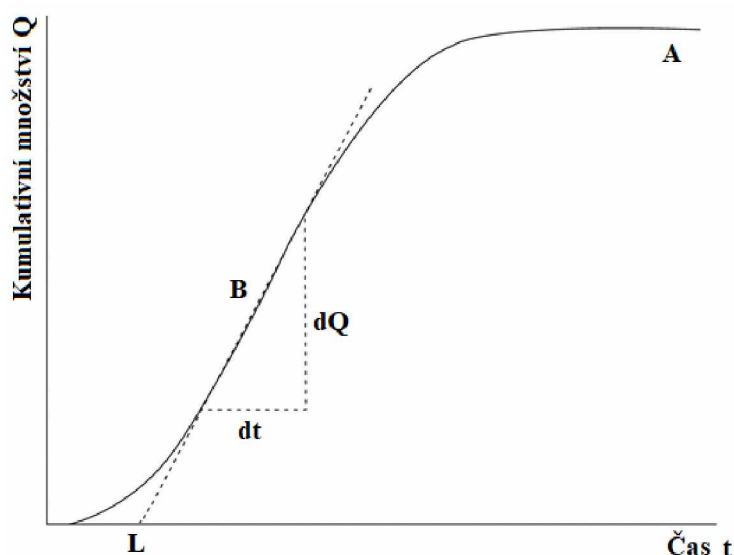
$$Q_x = \frac{1}{S} [(V_{cela} \times c_x) + V_{odběr} \sum_{i=1}^{x-1} c_i] \quad (1)$$

Kde  $Q_x$  je kumulativní množství v daném čase  $x$ ,  $S$  je plocha kožního modelu,  $V_{cela}$  značí objem difuzní cely,  $c_x$  je koncentrace testované látky při odběru,  $V_{odběr}$  značí objem jednoho odběru receptorové kapaliny, do které se absorbuje testovaná látka kůží,  $c_i$  je koncentrace testované látky prvního odběru receptorové kapaliny.

Parametr kumulativní množství se značí písmenem  $Q$ , který vyjadřuje celkové množství testované látky prošlé za daného času, přičemž počítá s korekcí úbytku testované látky v difuzních celách při odběrech.

Při testování *in vitro* se nejčastěji používají parametry Flux (tok) a Lag time. Tyto parametry slouží pro vyjádření míry a rychlosti penetrace testované látky procházející kůží. Flux je definován jako množství látky, které prostoupí za jednotku času přes určitou plochu kožního modelu do receptorové kapaliny [nmol/cm<sup>2</sup>/hod]. Lag time je definován jako doba, kdy se testovaná látka penetrující kůží objeví v receptorové kapalině [h]. Lag time je závislý na tloušťce kožního modelu, kdy při zvyšující tloušťce se zvyšuje i parametr Lag time [16] [28] [39] [44] [47].

Na obrázku 5 je graf znázorňující průběh absorpce látky aplikované ve formě tzv. konečné dávky. Jedná se o závislost kumulativního množství  $Q$  na času  $t$ . Průsečík  $L$  na ose  $x$  představuje parametr Lag time. Flux v ustáleném stavu se získá z gradientu  $dQ/dt$  lineární části grafu [47].



**Obrázek 5** – Průběh absorpce s konečnou dávkou [47]



## 1.9 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pro zjištění průběhu penetrace testované látky kůží do receptorové kapaliny se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Na obrázku 6 je znázorněno schéma kapalinového chromatografu.

Kapalinová chromatografie slouží k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich kvantity a kvality ve vzorku. Při kapalinové chromatografii se používá kapalná mobilní fáze. Separace látek se uskutečňuje mezi mobilní a stacionární fází. Z hlediska fyzikálně-chemického principu dělení můžeme kapalinovou chromatografii rozdělit na adsorpční, rozdělovací, iontově-výměnou, gelovou a afinitní chromatografii.

Pro transport mobilní fáze stacionární fází je zapotřebí vysokotlaké čerpadlo. Používají se lineární čerpadla, kde se dávkuje stejné množství mobilní fáze, avšak nemůže měnit složení mobilní fáze a jednopístová reciproční čerpadla, u kterých je možno měnit složení mobilní fáze. Nevýhodou jednopístového recipročního čerpadla jsou vznikající pulsy, které mohou být eliminovány například použitím druhého pracovního válce s pístem, pracujícím v opačné periodě. Díky použitému tlaku musí kolony odolávat vysokému tlaku mobilní fáze, a z toho důvodu se většinou používají tlustostěnné či ocelové trubice.

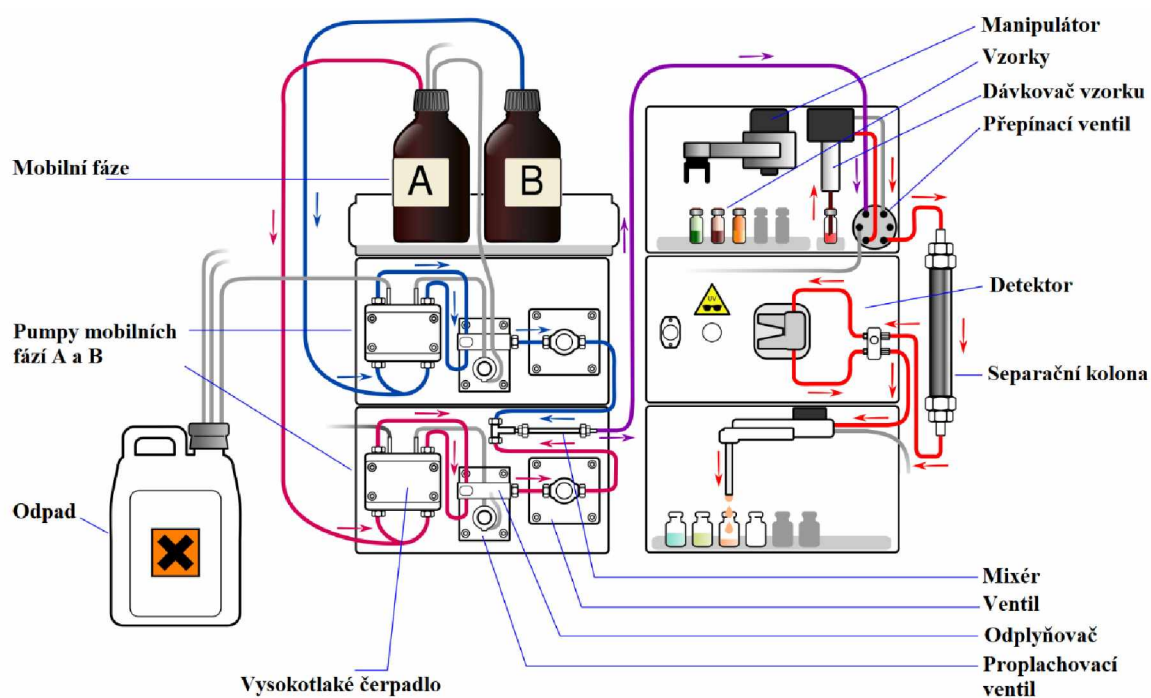
Aby bylo dosaženo vysoké účinnosti kapalinového chromatografu, je zapotřebí, aby stacionární fáze obsahovala velmi malé částice s pravidelným tvarem a jednotnou velikostí. Systémy se rozdělují podle relativní polaritý stacionární a mobilní fáze na systémy s normálními fázemi (polární sorbent) a na systémy s opačnými fázemi (nepolární sorbent). Mezi stacionární fáze patří silikagel, alumina. Mobilní fází může být hexan, heptan případně v systému s opačnými fázemi může být jako mobilní fáze voda ve směsi s acetonitrilem, methanolem a ethanolem.

Složení mobilní fáze má vliv na eluce. Pokud má mobilní fáze konstantní složení během analýzy, tak se jedná o izokratickou eluci. Pokud je složení mobilní fáze složité, tak nelze použít izokratickou eluci, nýbrž gradientovou eluci. U izokratické eluce zůstává polarita konstantní, na rozdíl u gradientové eluce, kdy se polarita v průběhu analýzy mění.

Dávkování vzorku u HPLC je problém, díky vysokému tlaku mobilní fáze. Je potřeba nastříknout vzorek s přesně definovaným objemem. Pro dávkování vzorku se používá šesticečný ventil s dávkovací smyčkou o definovaném objemu.

Detektor zaznamenává signál, který je dán rozdílem mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze, obsahující eluovanou složku neboli vzorek. Mezi používané detektory u HPLC

patří spektrofotometrický (DAD), fluometrický a hmotnostní detektor [48 - 51].



**Obrázek 6** – Schéma kapalinového chromatografu [52]

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité přístroje a vybavení

#### 2.1.1 Kapalinový chromatograf

Pro analýzu odebraných vzorků byl využíván vysokotlaký kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2 (obrázek 7).

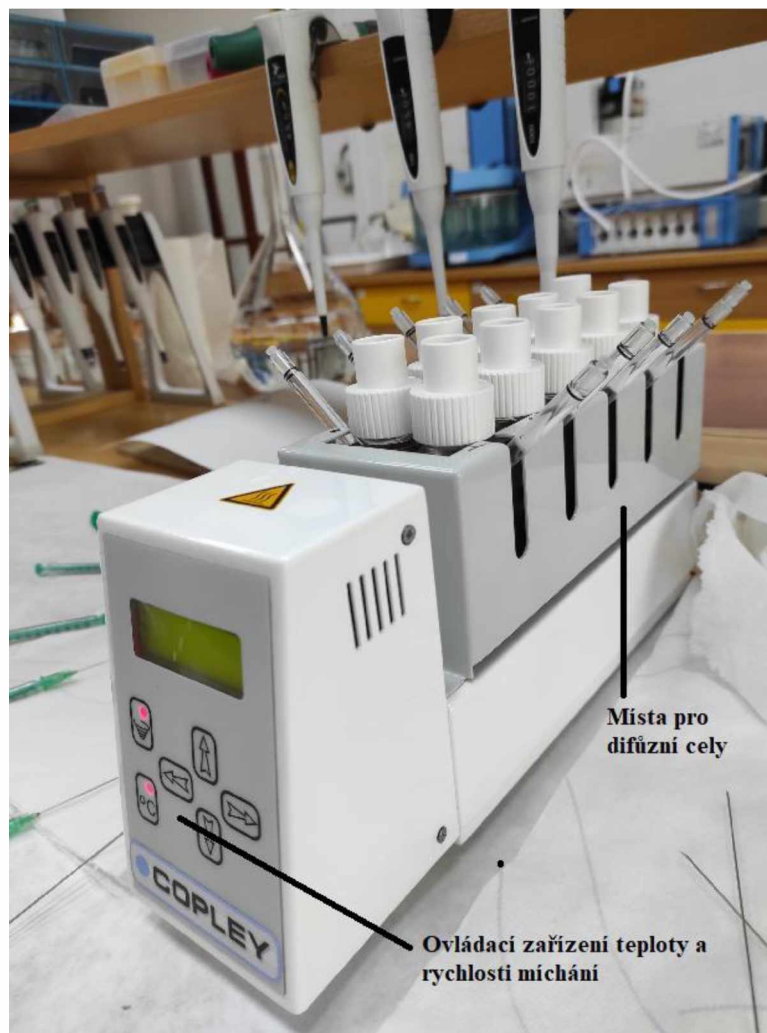


Obrázek 7 – Vysokotlaký kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2

#### 2.1.2 Vyhřívavý blok

Během testování penetrace kyseliny benzoové různými modely kůže, byly difuzní cely vloženy do vyhřívavého bloku. Pro testování byl využit vyhřívavý blok od firmy Copley Scientific. Během testování byla udržována stálá teplota receptorové kapaliny a rychlost míchání. Teplota

byla nastavena na 32 °C a rychlost míchání na hodnotu 400 RPM pro všechna měření. Ve vyhřívaném bloku může být celkem až 10 difuzních cel (obrázek 8).



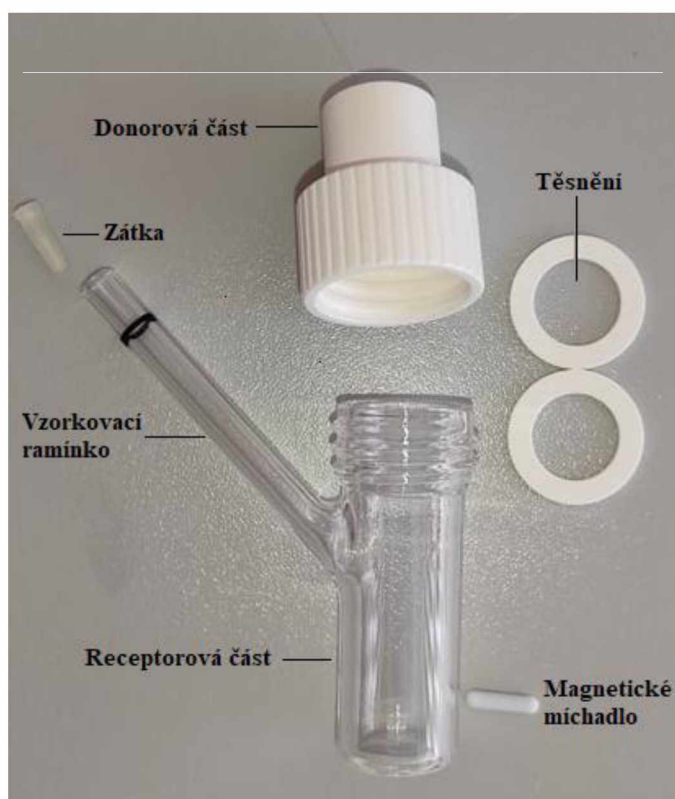
**Obrázek 8** – Vyhřívaný blok od firmy Copley Scientific

### **2.1.3 Vertikální šroubovací difuzní cely**

Pro testování penetrace kyseliny benzoové modely kůže, byly využívány vertikální difuzní cely se šroubením. Všechna testování byla prováděna na vertikálních difuzních celách od firmy Copley Scientific. Šroubovací difuzní cely jsou složeny z donorové a receptorové části, vzorkovacího ramínka, magnetického míchadla, gumové zátky a dvou těsnění, mezi něž se umísťuje kůže nebo kožní model (obrázek 9).

Do donorové části komůrky byla na povrch kůže aplikována kyselina benzoová. Receptorová část byla naplněna receptorovou kapalinou (fyziologický roztok) tak, aby se dotýkala kožního

modelu. Pro správný průběh penetrace musela být receptorová kapalina bez vzduchových bublin. Pomocí injekční stříkačky byly vzorkovacím ramínkem odebírané v určitém intervalu vzorky receptorové kapaliny, které byly převedeny do označených vialek. Odebíralo se 0,5 ml vzorku, a následně pomocí jiné injekční stříkačky byla cela doplněna 0,5 ml receptorové kapaliny, tak aby hladina v difuzní cele dosahovala po označenou rysku na vzorkovacím ramínku.



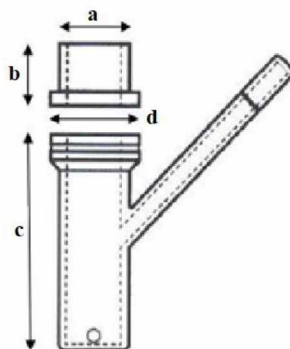
**Obrázek 9** – Vertikální difuzní cela od firmy Copley Scientific

Magnetické míchadlo slouží pro cirkulaci receptorové kapaliny, aby bylo dosaženo konstantní koncentrace kyseliny benzoové v celém objemu receptorové kapaliny. Model kůže byl vložen mezi obě těsnění tak, aby neunikala receptorová kapalina. Gumová zátka je vhodná tehdy, je-li v receptorové části těkavá kapalina, která by se během testování mohla vypařit.

Rozměry šroubovací cely jsou znázorněny v tabulce č. 1 s označenými částmi difuzní cely na obrázku 10.

**Tabulka 1** – Rozměry šroubovací cely Copley Scientific

Označení	Parametry	VDC se šroubením [mm]
a	Vnitřní průměr	15
b	Výška donoru	27
c	Výška receptoru	57
d	Vnější průměr	24
-	Styčná plocha cely [cm <sup>2</sup> ]	1,77
-	Objem cely (receptorová část) [ml]	12
-	Magnetické míchadlo	13×3



**Obrázek 10** – Rozměry vertikální difuzní cely od společnosti Copley Scientific

#### 2.1.4 Ultrazvuk

Pro odplynění a lepší rozpouštění roztoků byl využíván ultrazvuk Bendelin Sonorex RK540 (obrázek č. 11). Odplynění roztoků bylo důležité pro mobilní fáze do HPLC a pro fyziologický roztok.



**Obrázek 11** – Ultrazvuk Bendelin Sonorex RK540

### 2.1.5 Raznice

Raznice byla využívána pro vyražení modelu kůže ve tvaru kruhu o průměru 25 mm. K vyražení modelu kůže bylo kromě raznice využíváno kladivo, kterým se tlouklo na vrchní část raznice. Následně byl model kůže upraven nůžkami do požadovaného průměru. Model kůže musel dobře zapadnout do šroubovací cely, jinak by z důvodu špatného umístění kožního modelu mohla protékat receptorová kapalina. Na obrázku 12 je raznice.



**Obrázek 12 – Raznice**

### 2.1.6 Injekční stříkačky

K odběru vzorků během testování byly využívány injekční stříkačky Injekt – F od firmy B|BRAUN, o objemech 1 a 6 ml s jehlou (obrázek 13). Odběry vzorků za pomoci jehly, byly prováděny vždy ze středu receptorové části těsně nad magnetickým míchadlem.



**Obrázek 13 – Injekční stříkačky Injekt – F od firmy B|BRAUN**

### 2.1.7 Analytické váhy

Pro odvážení chemikálií byly využívány analytické váhy Mettler – Toledo XS205DU (obrázek 14). Nejčastěji pro odvážení kyseliny benzoové a chloridu sodného (fyziologický roztok).



**Obrázek 14** – Analytické váhy Mettler – Toledo XS205DU

### 2.1.8 Ruční krimpovací kleště

Krimpovací kleště sloužily pro zavírání vialek obsahující vzorky (obrázek 15). Pro uchování vzorků byly použity dva typy vialek-šroubovací a nešroubovací. Právě u nešroubovacích vialek byly zapotřebí tyto kleště, díky nimž bylo možno vialky uzavřít.



**Obrázek 15** – Ruční krimpovací kleště

### 2.1.9 Příklad na přípravu ultračisté vody (UPW)

Ultračistá voda byla připravena za pomoci zařízení s názvem Select Neptune Ultimate – Purite. UPW byla využívána pro přípravu všech roztoků.



## 2.2 Použité chemikálie

Pro testování kožní penetrace byly použity tyto chemikálie:

- Kyselina benzoová  $C_7H_6O_2$
- Chlorid sodný NaCl
- Trifluoroctová kyselina  $C_2HF_3O_2$  (TFA)
- Acetonitril  $C_2H_3N$  (ACN)
- Ultračistá voda (UPW)
- Ethanol  $C_2H_5OH$

## 2.3 Příprava roztoků

### 2.3.1 Příprava mobilní fáze A (MFA)

Mobilní fáze A byla připravena z ultračisté vody (UPW) a 10 mM kyseliny trifluoroctové (TFA). Pomocí odměrného válce byl do zásobní lahve odměřen 1 litr UPW a odpipetováno 0,77 ml TFA. Roztok v zásobní láhvi byl uzavřen a promíchán. Následně byla pootevřená láhev s roztokem vložena do ultrazvukové lázně, kde byl roztok odplyněn.

### 2.3.2 Příprava mobilní fáze B (MFB)

Mobilní fáze B byla připravena z acetonitrilu (ACN) a 10 mM TFA. Pomocí odměrného válce byl do zásobní lahve odměřen 1 l ACN. Pomocí automatické pipety bylo do zásobní láhve s ACN odpipetováno 0,77 ml TFA. Roztok v zásobní láhvi byl uzavřen a promíchán. Následně byla pootevřená láhev s roztokem vložena do ultrazvukové lázně, kde byl roztok odplyněn.

### 2.3.3 Příprava fyziologického roztoku (FR)

Fyziologický roztok byl připraven z chloridu sodného a UPW. Na vahách bylo odváženo 9 g chloridu sodného do připravené 1 000 ml odměrné baňky a přidáno cca 500 ml UPW. Pro lepší rozpouštění chloridu sodného byla baňka s roztokem vložena do ultrazvukové lázně. Po rozpouštění chloridu sodného v UPW byla odměrná baňka doplněna po rysku UPW.

### 2.3.4 Příprava roztoku kyseliny benzoové (c=4 g/l)

Roztok kyseliny benzoové o koncentraci 4 g/l byl připraven odvážením 100 mg kyseliny benzoové na analytických vahách, do 25 ml odměrné baňky. Následně byl do poloviny odměrné baňky ke kyselině benzoové přidán 50 % ethanol (130 ml UPW + 120 ml ethanolu (96 %)). Roztok byl následně vložen do ultrazvukové lázně pro lepší rozpouštění kyseliny benzoové. Následně byla baňka doplněna po rysku 50 % ethanolem.

### 2.3.5 Příprava standardů pro kalibrační křivku

Pro kvantitativní stanovení kyseliny benzoové byla použita metoda vnějšího standardu neboli kalibrační křivky. Bylo připraveno 6 standardů o různé koncentraci kyseliny benzoové. Do 100 ml odměrné baňky bylo na analytických vahách odváženo 10 mg kyseliny benzoové. Do baňky bylo následně přidáno 50 ml fyziologického roztoku (FR) a baňka byla umístěna pro lepší rozpouštění kyseliny benzoové do ultrazvukové lázně. Po rozpouštění kyseliny benzoové ve FR byla baňka doplněna po rysku FR. Takto připravený roztok byl označen jako zásobní roztok (SS) o koncentraci 100 mg/l kyseliny benzoové.

Následně z tohoto SS byly připraveny další roztoky. Příprava a ředění zbylých roztoků je uvedena v tabulce č. 2. Všechny připravené roztoky byly doplněny po rysku FR.

**Tabulka 2 – Příprava roztoků pro kalibrační křivku 0,01-100 mg/l**

Roztok	Objem FR [ml]	Ředění	Koncentrace [mg/l]
SS	100	-	102,2
S1	10	2 ml SS	20,44
S2	10	1 ml SS	10,22
S3	10	0,5 ml SS	5,11
S4	10	1 ml S2	1,022
S5	10	1 ml S4	0,102
S6	10	1 ml S5	0,0102

### 2.3.6 Příprava roztoků kyseliny benzoové pro zjištění její stability

Pro zjištění stability roztoků kyseliny benzoové byly připraveny 3 roztoky o různých koncentracích. Do 100 ml odměrné baňky bylo odváženo na analytických vahách 10,33 mg kyseliny benzoové. Do 2/3 baňky byl přidán fyziologický roztok a baňka s roztokem umístěna do ultrazvukové lázně. Následně byla baňka doplněna po rysku fyziologickým roztokem. Tímto způsobem byl získán roztok o koncentraci 103,3 mg/l. Následně byly z tohoto roztoku připraveny tři roztoky o koncentracích 10,33; 5,165 a 1,033 mg/l.

## 2.4 Použité kožní modely

Pro testování kožní penetrace byly využity prasečí kůže z ušních boltců, komerční prasečí kůže z ušních boltců, lidské kůže, syntetické membrány (M-Strat membrány) a čerstvé prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete.

### 2.4.1 Prasečí kůže z ušních boltců

Testování kožní penetrace probíhalo u 18 prasečích kůží z ušních boltců. Testování bylo rozděleno na 2 pokusy. Testovalo se u vybraných modelů prasečí kůže, které byly rozděleny podle tloušťky na tenké a silné modely kůže. U některých kožních modelů byly zaznamenány pigmentové skvrny a žilky.

### 2.4.2 Komerční prasečí kůže

Komerční prasečí kůže z ušních boltců jsou prodávány zmrazené v předem vyražených kůží ve tvaru kruhu o ploše 4,52 cm<sup>2</sup>. Testování komerčních prasečích kůží probíhalo ve dvou pokusech. Celkem bylo použito 20 vzorků komerčních prasečích kůží. V tabulkách č. 3 a 4 jsou uvedeny tloušťky kůží.

Tyto komerční kůže vykazovaly jistou variabilitu. Některé kůže obsahovaly žíly, které mohou urychlit kožní penetraci kyseliny benzoové. Byla rozdílná i tloušťka kůží. U prvního testování se v kožních modelech s č. 2,3 a 4 vyskytovaly žíly. U druhého testování se žíly vyskytly u kožních modelů s č. 2,3,8 a 9.

**Tabulka 3** – Tloušťky komerčních kůží

Model kůže	Tloušťka kůže [ $\mu\text{m}$ ]
1	966
2	1039
3	1069
4	1569
5	1990
6	1773
7	910
8	2686
9	1901
10	2549

**Tabulka 4** – Tloušťky komerčních kůží

Model kůže	Tloušťka kůže [ $\mu\text{m}$ ]
1	1110
2	2246
3	1075
4	1925
5	1246
6	2304
7	1891
8	1535
9	957
10	2523

### 2.4.3 Lidská kůže

Pro testování kožní penetrace byla použita lidská kůže. Lidská kůže je nejvhodnějším modelem pro metody *in vitro*, avšak možnosti získání lidské kůže jsou omezené. Lidská kůže je podřízena mezinárodním a národním etickým úvahám.

Použité lidské kůže Xenoskin byly od firmy Essence Line, s.r.o. Tyto lidské kůže byly dermatomované, což znamená, že kůže byly zbaveny spodní vrstvy dermis. Pro testování kožní penetrace bylo využito 10 modelů kůže. Bylo použito 7 lidských kůží z břišních částí od ženského dárce a 3 lidské kůže od mužského dárce (tabulka č. 5)

**Tabulka 5 – Popis lidských kůží**

Označení pozice kůže	Dárce	Číselné označení kůže
1,2,3 a 4	Ženský	1027-01-0619
5,6 a 7	Ženský	1023-01-0519
8,9 a 10	Mužský	1047-01,1019

### 2.4.4 M-Strat membrány

Pro testování kožní penetrace byly použity i syntetické Strat-M membrány. Podle pokynů výrobce nemusí být tyto membrány před testem hydratovány.

### 2.4.5 Prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete

Pro testování byla využita i čerstvá prasečí kůže z ušních boltců od domácího prasete (obrázek č. 16). Prase bylo zabito 17. března 2022 a test byl prováděn 22.–23. března 2022. Praseti byly odříznuty uši, které nesměly být spařeny, jinak by došlo k poškození vrchní vrstvy kůže.



**Obrázek 16 – Prasečí uši z domácího prasete**

## 2.5 Testování kožní penetrace

Celkem bylo provedeno 7 testování kožní penetrace při stejně definovaných podmínkách. Podmínky testování jsou znázorněny v tabulce č. 6. Doba testování byla kromě jednoho testování přibližně stejná, o délce 25 hodin.

**Tabulka 6** – Parametry při testování kožní penetrace

<b>Parametry</b>	<b>Popis</b>
Typ cely	Cela se šroubením
Plocha kožního modelu	1,77 cm <sup>2</sup>
Máčen model kůže	Ne
Koncentrace aplikované kyseliny benzoové	4 g/l
Objem aplikované dávky kyseliny benzoové	45 µl
Donorová kapalina	50 % ethanol
Receptorová kapalina	Fyziologický roztok
Objem receptorové kapaliny	12 ml
Teplota	32 °C
Míchání receptorové kapaliny	400 rpm
Objem odběru vzorku	0,5 ml
Okluze	Ne

### 2.5.1 Příprava kožních modelů před testem

Příprava kožních modelů patřila mezi nejdůležitější kroky testování kožní penetrace. Prasečí kůže z ušních boltců, komerční prasečí kůže a lidská kůže byly zmrazeny a musely být před testováním kožní penetrace vyjmuty z mrazáku, a při laboratorní teplotě rozmrazeny po dobu přibližně půl hodiny.

#### 2.5.1.1 Příprava prasečí kůže z ušních boltců

Prasečí kůže z ušních boltců byla vyndána z mrazáku a při laboratorní teplotě rozmrazena. Následně byly pomocí raznice do kůže vyraženy terčíky ve tvaru kruhu. Pro lepší vyražení modelu kůže bylo použito kladivo, kterým se tlouklo na horní část raznice. Pokud byla tloušťka kůže vyšší, tak nebylo model kůže možné vyrazit. V těchto případech byly použity nůžky, kterými se modely kůže upravily do požadované velikosti, tak aby se vešly do šroubovací cely.

### 2.5.1.2 Příprava prasečí kůže

Komerční prasečí kůže byly vyndány z mrazáku a při laboratorní teplotě se nechaly volně rozmrazit. Každá komerční kůže byla už vyražena do tvaru kruhu, zvlášť zabalena do obalu a označena. Při použití šroubovacích cel, musely být tyto kůže upraveny do požadované velikosti. Požadovaná velikost modelů kůže byla upravena pomocí nůžek.

### 2.5.1.3 Příprava lidské kůže

Lidské kůže byly vyndány z mrazáku a při laboratorní teplotě se nechaly volně rozmrazit. Každá lidská kůže byla už ve tvaru kruhu, zvlášť zabalena a označena. Z důvodu, že byly lidské kůže dermatomované, byla práce s nimi velmi složitá, z toho důvodu, že byly po tomto procesu velmi tenké. Některé modely kůže musely být upraveny nůžkami.

### 2.5.1.4 Příprava Strat-M membrány

Ačkoliv Strat-M membrány byly ve tvaru kruhu, tak se do šroubovacích cel jejich velikost musela upravit nůžkami. Podle výrobce membrán nemusí být tyto membrány před testem hydratovány.

### 2.5.1.5 Příprava prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete

Příprava prasečí kůže z domácího chovu byla nejsložitější. Získané nespařené prasečí uši byly vodou zbaveny nečistot. Následně bylo nutné tyto prasečí uši oholit za pomoci holicího strojku. Holení muselo probíhat opatrně, tak aby nedošlo k poškození kůže, jinak by tato poškozená část kůže nebyla vhodná pro testování kožní penetrace. Následně byly za pomoci skalpelu odříznuty z vnitřní části ucha pláty kůže (obrázky 17,18).



**Obrázek 17** – Prasečí ucho po odříznutí kůže skalpelem



**Obrázek 18** - Odříznutá část kůže z prasečího ucha

Ze získaných odříznutých kůží byly pomocí raznice vyraženy modely kůže ve tvaru kruhu (obrázek č. 19). Ze dvou uší bylo získáno 16 modelů kůže. Na testování bylo využito 10 modelů kůže.



**Obrázek 19** – Modely prasečí kůže domácího prasete

### 2.5.2 Příprava šroubovacích difuzních cel

Před testováním byly vyčištěné difuzní cely umístěny do vyhřívaného bloku na 32 °C a rychlost míchání byla nastavena na 400 rpm. Do každé cely bylo umístěno magnetické míchadlo, pro lepší rozmíchání receptorové kapaliny. Mezi obě těsnění šroubovacích difuzních cel byly vloženy modely kůže. Model kůže musel dobře sedět ve šroubovací cele, jinak by docházelo k protékání receptorové kapaliny. Horní část difuzní cely s modelem kůže byla zašroubována do receptorové části.

Připravený fyziologický roztok byl před testováním odplyněn v ultrazvukové lázni, jelikož vzduchové bublinky byly v roztoku během testování kožní penetrace nežádoucí. Pomocí injekční stříkačky s jehlou byla receptorová část naplněna fyziologickým roztokem (receptorová kapalina) přes vzorkovací ramínko. Fyziologický roztok musel pomalu stékat po vzorkovacím ramínku, tak aby nedocházelo ke vzniku bublin. Tímto způsobem byly naplněny všechny cely. Šroubovací cely o objemu 12 ml byly doplněny fyziologickým roztokem po označenou rysku na vzorkovacím ramínku. Takto připravené difuzní cely naplněné receptorovou kapalinou se nechaly ve vyhřívaném bloku vyhřát na teplotu 32 °C. Před samotnou aplikací testované látky byly cely zbaveny bublinek, které byly v receptorové kapalině, nebo pod modelem kůže. Pokud by tam zůstaly vzduchové bubliny, tak by nedocházelo k absorpci testované látky do receptorové kapaliny a výsledky by byly zkreslené.

### **2.5.3 Příprava před testováním**

Před započítím testování byl pracovní prostor důkladně vyčištěn, aby se zamezilo znečištění testované látky, difuzních cel a receptorové kapaliny. Pro odběr vzorku z každé difuzní cely byla připravena injekční stříkačka s jehlou, která byla označena číslem patřící umístění difuzní cely ve vyhřívaném bloku. Injekční stříkačky pro odběry vzorků byly o objemu 1 ml. Pro doplňování difuzních cel fyziologickým roztokem byla připravena injekční stříkačka o objemu 6 ml, která byla pro všechny cely stejná. Před testováním byly připraveny vialky do stojanu a označeny příslušným číslem patřícím umístění difuzní cely, ze které byl odebrán vzorek a číslem pořadí odběru.

### **2.5.4 Průběh testování**

Po vyhřátí difuzních cel a zbavení všech bublinek v receptorové kapalině byla aplikována testovaná látka. Jako testovaná látka byla použita kyselina benzoová o koncentraci 4 g/l rozpuštěná v 50 % ethanolu, přičemž tento roztok byl před testováním již připraven a uschován v chladničce. Roztok kyseliny benzoové byl odlit do mikrozkuřavky pro lepší dávkování. Na automatické pipetě byl nastaven objem 45  $\mu$ l. Pomocí automatické pipety byla testovaná látka aplikovaná do donorové části na model kůže o objemu 45  $\mu$ l. S nadávkováním testované látky na první model kůže byly zapnuty stopky. Testovaná látka byla aplikována na modely kůže v intervalu 2 minut. Tento interval byl dodržen i při odběrech vzorků.

Aby bylo zjištěno, zda kožní model neuvolňuje do receptorové kapaliny kyselinu benzoovou, byla zvolena jedna cela s modelem kůže, kde nebyla aplikována testovaná látka kyseliny benzoové. Pokud by byla zjištěna přítomnost kyseliny benzoové v receptorové kapalině, musela by se tato koncentrace odečíst od všech koncentrací zbylých vzorků.

Odebírání vzorku probíhalo v určitých intervalech. Ze začátku se vzorky odebíraly častěji a postupně se interval odběru zvyšoval. Celková doba testování byla do 24-25 hodin od nadávkování testované látky. U prvního testování komerčních prasečích kůží, probíhalo testování do 11 hodin. Podle použitého modelu kůže byly intervaly odběru trochu odlišné.

Vzorky se odebíraly pomocí injekční stříkačky s jehlou. Každá difuzní cela měla pro odběr vzorku vlastní injekční stříkačku s jehlou, aby se zabránilo znečištění receptorové kapaliny jinou receptorovou kapalinou. Jehla byla zavedena vzorkovacím rámečkem doprostřed receptorové kapaliny těsně nad magnetickým míchadlem, kde byl odebrán vzorek. Odebíralo se vždy ze stejného místa. Vždy se odebíralo 0,5 ml vzorku, který byl převeden do předem označené vialky. Pomocí druhé injekční stříkačky bylo do cely nadávkováno odebrané



množství, tedy 0,5 ml. Hladina receptorové kapaliny sahala vždy po označenou rysku na vzorkovacím ramínku. Vialky se vzorkem byly ihned uzavřeny víčkem.

Při odběru vzorků a doplňování receptorové kapaliny byla zvýšená pozornost na výskyt bublinek. Vzniklé bublinky by se mohly dostat do místa pod modelem kůže, či membrány a mohly by ovlivnit absorpci kyseliny benzoové do receptorové kapaliny. Vzniklé bubliny musely být ihned odstraněny. Bubliny byly odstraněny buď pomocí jehly, nebo nakloněním difuzní cely tak, aby vzniklé bubliny unikly přes vzorkovací ramínko ven.

#### **2.5.4.1 Průběh testování prasečích kůží z ušních boltců**

První testování probíhalo 24.-25. února 2022 a druhé testování probíhalo 1.-2. března 2022. Testování bylo rozděleno na 2 pokusy s 18 modely kůží. Testovalo se u vybraných modelů prasečí kůže, které byly rozděleny podle tloušťky na tenké a silné modely kůže.

Po aplikování kyseliny benzoové na kožní modely byly spuštěny stopky. Obě testování probíhala po dobu 25 hodin. První 2 hodiny testování probíhaly odběry po 20 minutách. Další 3 hodiny testování probíhaly odběry v intervalu 30 minut. Pak se vzorky odebíraly po dobu 2 hodin, v intervalu jedné hodiny. Poslední odběry byly po 23, 24 a 25 hodinách od nadávkování testované látky na kožní model.

##### Testování 1: Penetrace kyseliny benzoové za použití prasečí tenké kůže

Cela s č. 10 byla bez aplikované dávky. Během 1 hodiny byl pozorován únik malých bublinek. Tyto vzniklé bublinky byly po každém odběru odstraněny, aby neovlivňovaly průběh kožní penetrace. Příčinou vzniku malých bublin může být způsobeno dýcháním kůže. Během testování lehce protékala cela s číslem 2. Po testu byla tato cela zasolena. U cel s č. 1,2 a 10 byly kůže lehce propadlé a u cely s č. 5 byla kůže lehce vyboulená. U kontroly difuzních cel a kůží po 23 hodinách testování bylo zjištěno, že kůže byla u cel s č. 1, 2, 4, 5, 7 a 10 lehce propadlá. U cely s č. 2 byla zpozorována bublina pod membránou, která byla ihned odstraněna. Kromě cel s č. 5 a 10 byla receptorová kapalina silně zakalená.

##### Testování 2: Penetrace kyseliny benzoové za použití prasečí silné kůže

Bylo testováno 8 prasečích modelů silné kůže. Ani u jedné z cel nebyl pozorován únik receptorové kapaliny. U cel s č. 1 a 9 byla kůže lehce vyboulená. U cel č. 7 a 10 byla kůže lehce propadlá. Zbylé kůže byly natažené v difuzních celách. Po 23 hodinách testování byla u cel s č. 1,3,8 a 9 receptorová kapalina silně zakalená. U cely s č. 1 byly zpozorovány pod modelem kůže malé bublinky, které byly ihned odstraněny.

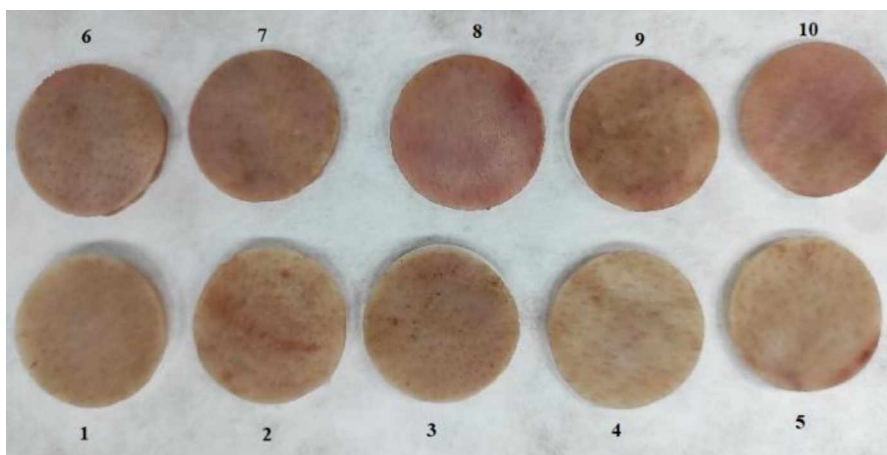
#### 2.5.4.2 Průběh testování komerčních prasečích kůží

Testování probíhalo 8.-9. března 2022 a druhé testování probíhalo 10.-11. března 2022. Testování komerčních prasečích kůží probíhalo ve dvou pokusech. Celkem bylo použito 20 komerčních prasečích kůží, kdy 2 modely kůže byly bez aplikace kyseliny benzoové. Ani u jedné z cel s kožním modelem nebyla zjištěna přítomnost kyseliny benzoové v receptorové kapalině.

##### Testování 3: Penetrace kyseliny benzoové za použití komerční prasečí kůže

První testování probíhalo s 10 kůžemi, kde byla aplikována kyselina benzoová do všech cel. První 2 hodiny se vzorky odebíraly v intervalu 20 minut, další 3 hodiny byl interval po 30 minutách. Dalších 5 hodin se vzorky odebíraly po hodině. V poslední hodině se interval zkrátil na 30 minut. Celkem se testovalo 11 hodin. Na obrázku č. 20 jsou komerční prasečí kůže před testováním kožní penetrace.

Během testování byly sledovány změny barvy kožních modelů, zakalenost receptorové kapaliny a protékání difuzních cel přes těsnění. Během prvních 2 hodin byl sledován vznik malých bublinek pod membránou. Tyto vzniklé bublinky byly po každém odběru odstraněny, aby neovlivňovaly průběh kožní penetrace.



**Obrázek 20** – Komerční prasečí kůže před testováním kožní penetrace

U cely s číslem 10 bylo během testování zpozorováno lehké unikání receptorové kapaliny z difuzní cely. Unikání receptorové kapaliny mohlo být způsobeno špatným umístěním kožního modelu. Kožní model přesahoval přes těsnění a tím mohl vytvořit průchod pro receptorovou kapalinu. U cel s čísly 1 a 10 byly objeveny během prvního dne testování bublinky pod membránou, které byly ihned odstraněny nakloněním difuzní cely. U kontroly difuzních cel a

kůži po 23 hodinách testování, bylo zjištěno u cely 10 vznik bublin pod membránou. Po 23 hodinách byl také zpozorován propad kůží u cel s čísly 1 a 10. Po skončení testování byla receptorová kapalina silně zakalena u cel s čísly 6, 9 a 10. U zbylých cel byla receptorová kapalina málo zakalená. Na obrázku č. 21 jsou komerční prasečí kůže po testování kožní penetrace.



**Obrázek 21** – Komerční prasečí kůže po testování kožní penetrace

#### Testování 4: Penetrace kyseliny benzoové za použití komerční prasečí kůže

Druhé testování probíhalo za použití 10 komerčních prasečích kůží. Na poslední dva modely kůží nebyla aplikována testovaná látka. U difuzních cel bez aplikace probíhaly odběry vzorků ve stejném intervalu jako u difuzních cel s aplikací testované látky. U zbylých difuzních cel byla aplikována testovaná látka kyseliny benzoové. Od první aplikace testované látky byly spuštěny stopky. První 2 hodiny se vzorky odebíraly v intervalu 20 minut, další 3 hodiny byl interval po 30 minutách. Další 3 hodiny se vzorky odebíraly po hodině. Poslední odběry byly po 23, 24 a 25 hodinách od nadávkování testované látky na kožní model.

Po začátku testování byl zpozorován únik receptorové kapaliny u cely s číslem 10. U této cely naštěstí nebyla aplikována testovaná látka. Kožní model v cele č. 10 byl lehce zkroucený. Po 40 minutách byl zpozorován lehký únik receptorové kapaliny u cely s číslem 5, jelikož nebyla utažená donorová část. Po utažení cely již receptorová kapalina neunikala. Během testování nebyl zpozorován jiný únik receptorové kapaliny nežli u cely s číslem 10. U cely s číslem 1 byla objevena bublina pod membránou, která byla ihned odstraněna nakloněním difuzní cely. Po 23 hodinách testování byl zpozorován propad kožního modelu u cel s čísly 1,3 a 5. U cel s čísly 6 a 10 byla receptorová kapalina hodně zakalena.

### 2.5.4.3 Průběh testování lidské kůže

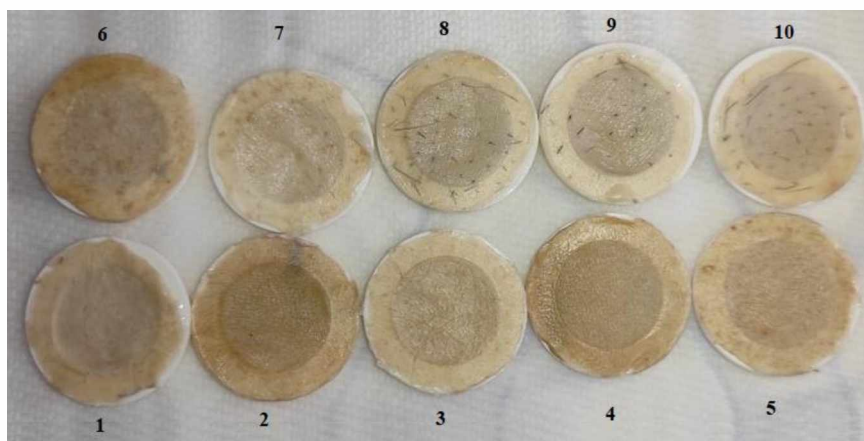
#### Testování 5: Penetrace kyseliny benzoové za použití lidské kůže

Testování probíhalo 17.-18. března 2022. Bylo použito celkem 10 lidských kůží. Jedna difuzní cela s číslem 10 byla bez aplikace testované látky. U cely s kožním modelem č. 10 nebyla zjištěna přítomnost kyseliny benzoové v receptorové kapalině.

Po aplikování testované látky byly zapnuty stopky. První 2 hodiny se vzorky odebíraly v intervalu 20 minut, další 3 hodiny byl interval po 30 minutách. Další 2 hodiny se vzorky odebíraly po 1 hodině. Poslední odběry byly po 23 a 24 hodinách od nadávkování testované látky na kůži.

Hned po začátku testování byl zpozorován lehký únik receptorové kapaliny u cely s číslem 3. Únik kapaliny mohl být způsoben špatně umístěným kožním modelem mezi obě těsnění. U všech lidských modelů bylo zpozorováno lehké vyboulení kůží. Mohlo to být tím, že kůže byly dermatovány a tím pádem byly velmi tenké a pružné. Vždy při odběru vzorku byl zpozorován propad kůže, díky úbytku receptorové kapaliny. Během první hodiny se objevovaly pod membránou malé bublinky pod kůží, které byly vždy ihned odstraněny, aby nerušily průběh kožní penetrace. U cely s číslem 3 byly objeveny bubliny pod membránou, které byly ihned odstraněny nakloněním difuzní cely.

Díky tomu, že lidské kůže byly dermatovány, tak kožní penetrace testované látky probíhala velmi rychle a první den se odebíraly vzorky do 7 hodin od nadávkování testované látky. Po 23 hodinách byla propadlá kůže u difuzních cel s čísly 3, 7 a 10. U cely s číslem 3 byl zpozorován úbytek receptorové kapaliny. Bublina pod kůží byla pozorována u difuzních cel s čísly 1 a 3. Receptorová kapalina byla u všech cel téměř bez zákalu. Na obrázku č. 22 jsou lidské kůže po 24 hodinách testování kožní penetrace.



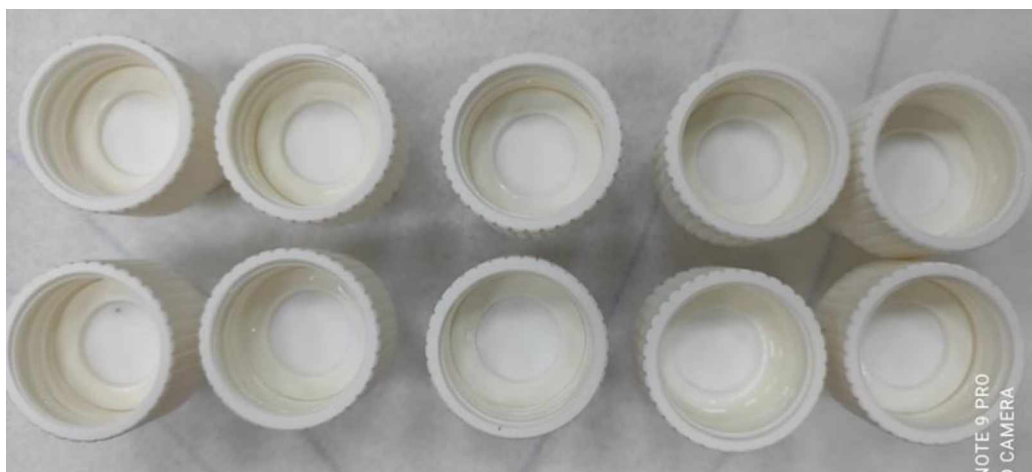
**Obrázek 22** – Lidské kůže po testování kožní penetrace

#### 2.5.4.4 Průběh testování Strat-M membránou

##### Testování 6: Penetrace kyseliny benzoové za použití Strat-M membrány

Testování probíhalo 15.-16. března 2022. Bylo použito celkem 10 syntetických membrán. Jedna difuzní cely s číslem 10 byla bez aplikace testované látky. U cely se Strat-M membránou s číslem 10 nebyla zjištěna přítomnost kyseliny benzoové v receptorové kapalině.

Po aplikování testované látky byly zapnuty stopky. První 2 hodiny se vzorky odebíraly v intervalu 20 minut, další 3 hodiny byl interval po 30 minutách. Další 3 hodiny se vzorky odebíraly po hodině. Poslední odběry byly po 23, 24 a 25 hodinách od nadávkování testované látky na membránu. Na obrázku č. 23 jsou Strat-M membrány v donorové části difuzních cel.



**Obrázek 23** – Strat-M membrány po testování umístěné ve šroubení difuzní cely

Během první hodiny testování se pod kožními modely objevovaly malé bublinky. Tyto vzniklé bublinky byly odstraňovány. Během testování protékaly difuzní cely s číslem 5 a 10. Syntetická membrána u difuzní cely s číslem 5 byla špatně sestříhnuta, a proto unikala receptorová kapalina. U difuzní cely s číslem 10 nebyl shledán důvod protékání. Během testování se objevily bublinky v difuzní cele s číslem 5 a 10, které byly ihned odstraněny, aby se nedostaly pod membránu, kde by negativně ovlivnily kožní penetraci testované látky. Byly zpozorovány menší bublinky na stěnách difuzních cel s čísly 1 a 4, které byly odstraněny.

#### **2.5.4.5 Průběh testování prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete**

##### Testování 7: Penetrace kyseliny benzoové za použití prasečí kůže z domácího prasete

Testování probíhalo 22.-23. března 2022. Bylo použito celkem 10 prasečích kůží. Jedna difuzní cela s číslem 10 byla bez aplikace testované látky. U cely s kožním modelem číslem 10 byla zjištěna přítomnost kyseliny benzoové v receptorové kapalině, a proto tato koncentrace byla odečtená od koncentrací vzorků, kde byla aplikována testovaná látka.

Po aplikování testované látky byly zapnuty stopky. První 2 hodiny se vzorky odebíraly v intervalu 20 minut, další 3 hodiny byl interval po 30 minutách. Další 4 hodiny se vzorky odebíraly po hodině. Poslední odběry byly po 23 a 24 hodinách od nadávkování testované látky na kožní model.

Během první hodiny testování se pod kožními modely objevovaly malé bublinky. Tyto vzniklé bublinky byly odstraňovány. Kožní modely s čísly 1-8 v difuzních celách byly dobře nataženy, ale kožní modely s čísly 9 a 10 byly lehce propadlé. Během testování lehce unikala receptorová kapalina u difuzní cely s číslem 10. Po 24 hodinách testování byla zpozorována u difuzních cel s čísly 3 a 10 menší bublina pod membránou. Propadlá kůže byla u difuzní cely č. 10, zbylé kůže byly dobře nataženy v difuzních celách. Receptorová kapalina byla silně zakalená u difuzních cel s čísly 1,3,4,6 a 7.

## 2.6 Analýza vzorků

Analýza vzorků probíhala pomocí vysokotlakého kapalinového chromatografu Shimadzu Nexera X2. Označené vialky s odebranými vzorky byly vloženy do autosampleru HPLC. Celkem se do autosampleru najednou vešlo 105 vzorků. Analýza vzorků s kyselinou benzoovou probíhala za definovaných podmínek (tabulka č. 7), kdy byla použita validovaná metoda.

**Tabulka 7 – Podmínky při analýze vzorků**

Parametry	Hodnoty
Přístroj	Shimadzu Nexera
Kolona v HPLC	InertClone 5 $\mu\text{m}$ ODS (2) 150 $\text{\AA}$ ; 150 x 4.6 mm
Průtok MF [ml/min]	1,5
MFA	10 mM TFA / UPW
MFB	10 mM TFA / Acetonitril
Poměr MF A:B	50:50 (isokratika)
Objem nástřiku [ $\mu\text{l}$ ]	20
Vlnová délka $\lambda$ [nm]	240
Teperace kolony [ $^{\circ}\text{C}$ ]	30
Čas analýzy [min]	4
RT (kyselina benzoová) [min]	1,78

## 2.7 Vyhodnocení výsledků

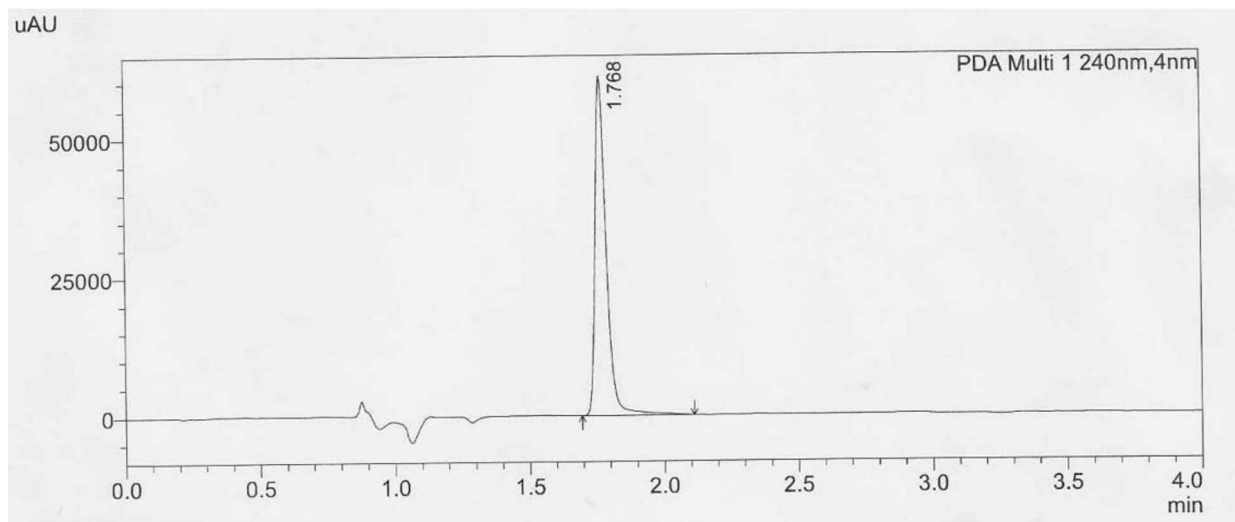
Pomocí HPLC byl získán chromatografický záznam, ze kterého byla určena kvantita kyseliny benzoové. Množství (kvantita) kyseliny benzoové bylo stanoveno z velikostí plochy píku. Pro stanovení koncentrace odebraných vzorků byla použita metoda kalibrační křivky. Po vyhodnocení kvantitativního množství (koncentrace) kyseliny benzoové bylo vypočítáno kumulativní množství kyseliny benzoové v daném čase z rovnice (1) v kapitole 1.8.

Pro vyhodnocení hodnot Fluxu a Lag time byl použit software SAMPA z Univerzity Karlovy nacházející se v Hradci Králové. Do softwaru byly zadávány hodnoty kumulativního množství v závislosti na čase.

### 3 VÝSLEDKY

#### 3.1 Chromatografický záznam kyseliny benzoové

Na obrázku č. 24 je znázorněn chromatografický záznam kyseliny benzoové o koncentraci 5,37 mg/l rozpuštěný ve fyziologickém roztoku. Analýza probíhala při vlnové délce 240 nm. Pík kyseliny benzoové se nacházel v retenčním čase 1,768 min.



**Obrázek 24** – Chromatografický záznam kyseliny benzoové o  $c=5,37$  mg/l

#### 3.2 Kalibrační křivka

Pro stanovení neznámých koncentrací kyseliny benzoové ve vzorcích byla použita metoda vnějšího standardu. Bylo připraveno 6 standardů o známé koncentraci. Tyto standardy byly analyzovány pomocí HPLC za stejných podmínek jako analýza odebraných vzorků (tabulka č. 6). Z každého chromatografického záznamu byly získány plochy píku jednotlivých standardů, které jsou zobrazeny v tabulce č. 8.

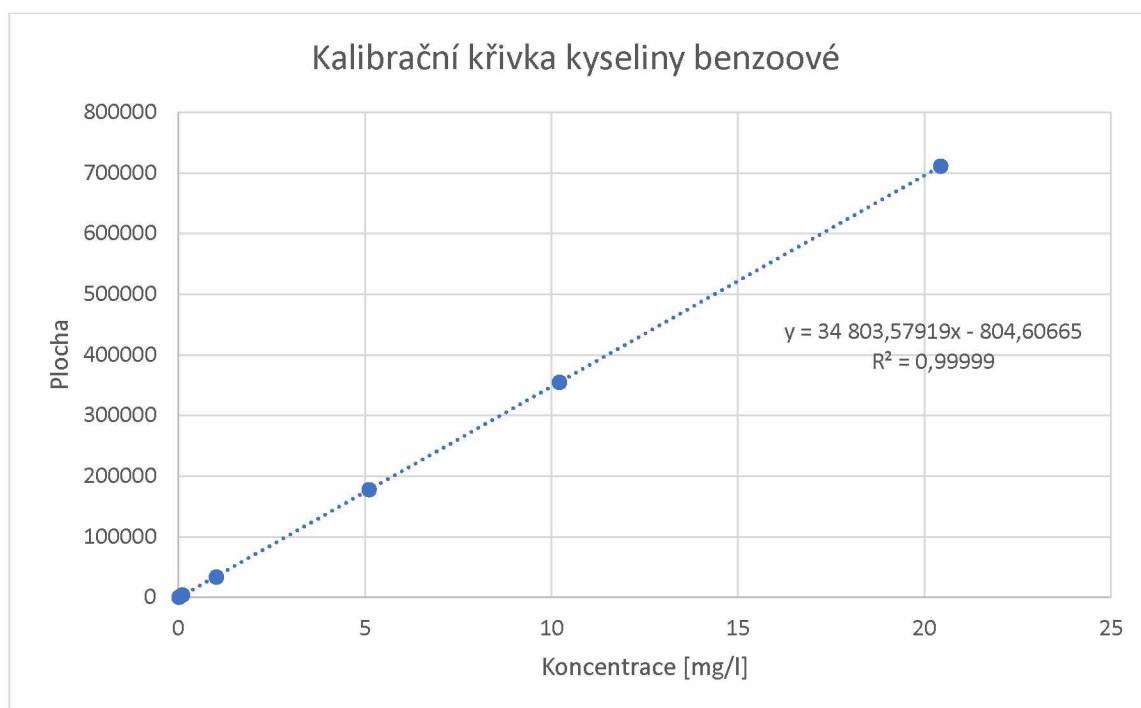


**Tabulka 8** – Koncentrace standardů a jejich plochy

Koncentrace [mg/l]	Plocha píku
0,0102	169
0,102	3407
1,02	33154
5,11	177607
10,22	354415
20,44	710749

Ze známých koncentrací jednotlivých standardů a ze získaných ploch byla vytvořena kalibrační křivka kyseliny benzoové (graf č. 1). Z kalibrační křivky byla získána rovnice, ze které byly vypočítány koncentrace kyseliny benzoové odebraných vzorků. Hodnota spolehlivosti  $R^2$  byla 0,99999. Čím bližší hodnota spolehlivosti je k 1, tím přesněji jsou standardy připraveny.

**Graf 1** – Kalibrační křivka kyseliny benzoové



### 3.3 Stabilita roztoků

Nejprve byly připraveny 3 roztoky o známé koncentraci. Připravené roztoky byly analyzovány pomocí HPLC za stejných podmínek jako analýza odebraných vzorků (tabulka č. 7). Roztoky byly uchovány po celou dobu v chladničce. Před analýzou byly roztoky vyndány z chladničky a odebrány do připravených vialek. Analýza stability roztoků probíhala po dobu 72 hodin v intervalu 24 hodin. Změřené hodnoty jsou v tabulkách č. 9, 10 a 11. Největší změny byly zaznamenány u roztoku s koncentrací 10,33 mg/l. Z naměřených hodnot je patrné, že roztoky byly stabilní.

**Tabulka 9** – Závislost plochy píku kyseliny benzoové na čase (c=1,033 mg/l)

Koncentrace [mg/l]	Čas [hod]	Plocha píku	Výška píku	Změna ploch %
1,033	0	35705	12234	0
	24	35657	12198	-0,1344
	48	35656	12048	-0,1372
	72	35641	12047	-0,1792

**Tabulka 10** – Závislost plochy píku kyseliny benzoové na čase (c=5,165mg/l)

Koncentrace [mg/l]	Čas [hod]	Plocha píku	Výška píku	Změna ploch %
5,165	0	174805	59538	0
	24	174915	59197	+0,0629
	48	173460	58226	-0,7694
	72	172764	57779	-1,1676

**Tabulka 11** – Závislost plochy píku kyseliny benzoové na čase (c=10,33 mg/l)

Koncentrace [mg/l]	Čas [hod]	Plocha píku	Výška píku	Změna ploch %
10,33	0	352287	119579	0
	24	351170	118649	-0,3171
	48	348318	116890	-1,9782
	72	344840	115639	-2,1139

### 3.4 Prasečí kůže z ušních boltců

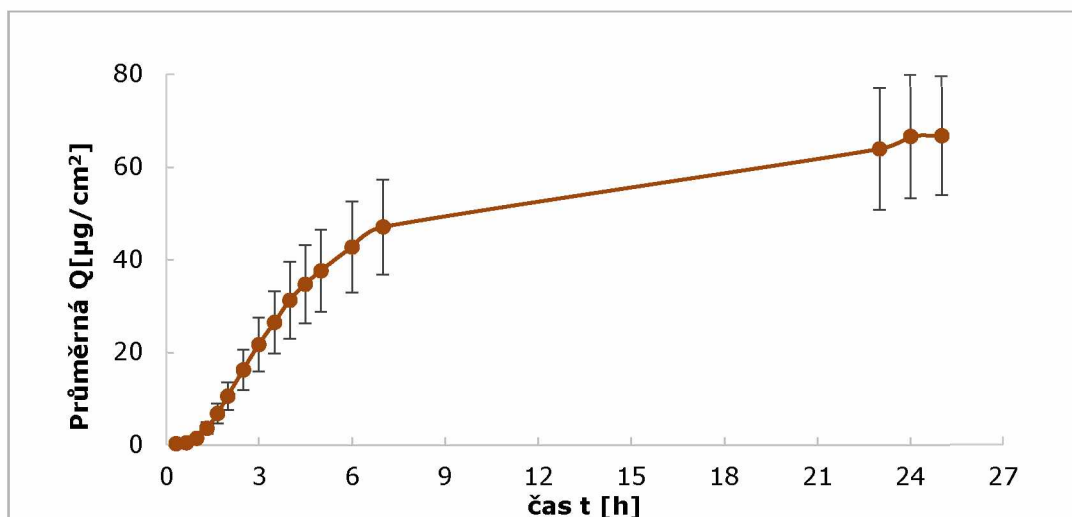
#### Testování 1: Penetrace kyseliny benzoové za použití prasečí tenké kůže

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze A a B. Cela s č. 10 byla bez aplikace testované látky. U cely s č. 2 byl zpozorován únik receptorové kapaliny. Tato cela nebyla započítána do celkového hodnocení. Při prvním odběru byla již kyselina benzoová přítomna v receptorové kapalině, avšak její koncentrace zůstávala téměř po dobu 40 minut neměnná. V tabulce č. 12 jsou znázorněny hodnoty Fluxu, Lag time a vstřebání kyseliny benzoové. V grafu č. 2 je zobrazena absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q.

**Tabulka 12** – Hodnoty penetrace (prasečí tenká kůže)

FDC	Flux	Lag time	vstřebání
	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	[h]	[%]
1	11,664	1,09	82,78
3	9,555	0,55	54,44
4	9,533	1,19	75,00
5	12,813	0,99	73,33
6	8,398	1,15	63,89
7	5,889	0,64	55,56
8	5,856	0,65	40,00
9	12,685	0,88	72,78
<b>průměr</b>	<b>9,55</b>	<b>0,89</b>	<b>64,72</b>
<b>medián</b>	<b>9,54</b>	<b>0,93</b>	<b>68,33</b>
<b>SD</b>	<b>2,58</b>	<b>0,24</b>	<b>13,10</b>
<b>RSD</b>	<b>27,04</b>	<b>26,29</b>	<b>20,24</b>
<b>min</b>	<b>5,86</b>	<b>0,55</b>	<b>40,00</b>
<b>max</b>	<b>12,81</b>	<b>1,19</b>	<b>82,78</b>

**Graf 2** – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (prasečí tenká kůže)



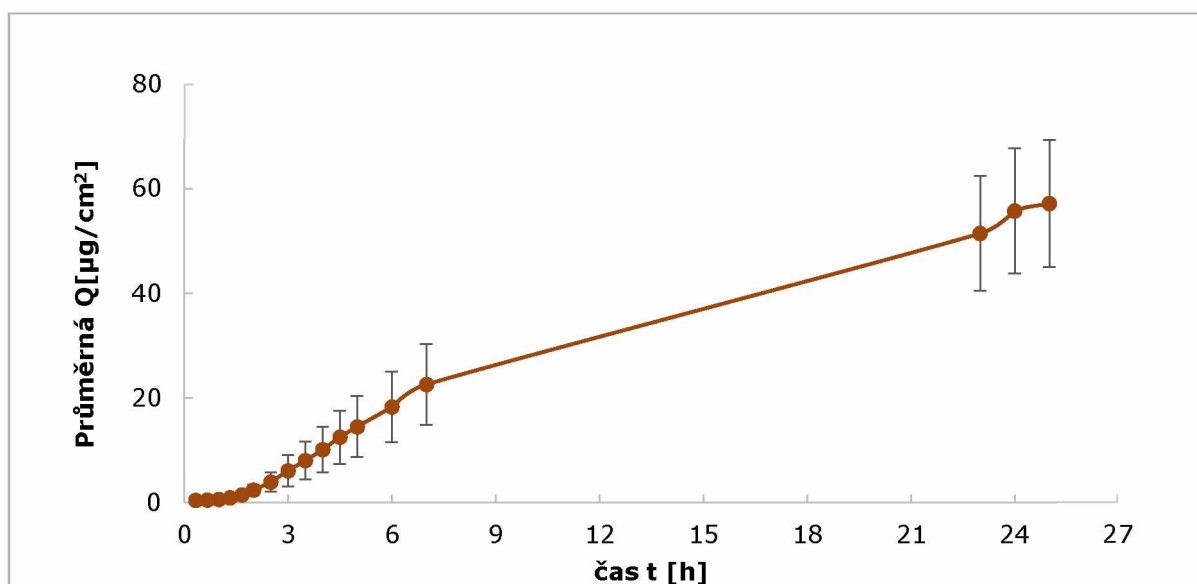
## Testování 2: Penetrace kyseliny benzoové za použití prasečí silné kůže

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze C a D. Během testování neunikala receptorová kapalina z žádné difuzní cely. Kyselina benzoová byla přítomna v prvním odběru vzorku a její koncentrace zůstávala neměnná po dobu 1 hodiny. Díky kratší době testování nebyla získána křivka esovitého tvaru, kde byl zaznamenán zlom, kdy množství kyseliny benzoové už tolik nestoupá. V tabulce č. 13 jsou hodnoty penetrace a v grafu č. 3 je znázorněna absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q.

**Tabulka 13** – Hodnoty penetrace (prasečí silné kůže)

FDC	Flux	Lag time	vstřebání
	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	[h]	[%]
1	3,824	2,13	60,00
2	3,757	2,38	56,11
3	6,393	1,85	69,44
4	2,305	2,79	40,00
5	2,385	1,24	42,22
6	4,831	1,16	45,56
7	5,595	1,43	61,11
8	5,905	1,68	75,00
<b>průměr</b>	<b>4,38</b>	<b>1,83</b>	<b>56,18</b>
<b>medián</b>	<b>4,33</b>	<b>1,77</b>	<b>58,06</b>
<b>SD</b>	<b>1,49</b>	<b>0,59</b>	<b>12,75</b>
<b>RSD</b>	<b>30,62</b>	<b>30,79</b>	<b>22,70</b>
<b>min</b>	<b>2,31</b>	<b>1,16</b>	<b>40,00</b>
<b>max</b>	<b>6,39</b>	<b>2,79</b>	<b>75,00</b>

**Graf 3** – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (prasečí silné kůže)



### 3.5 Komerční prasečí kůže

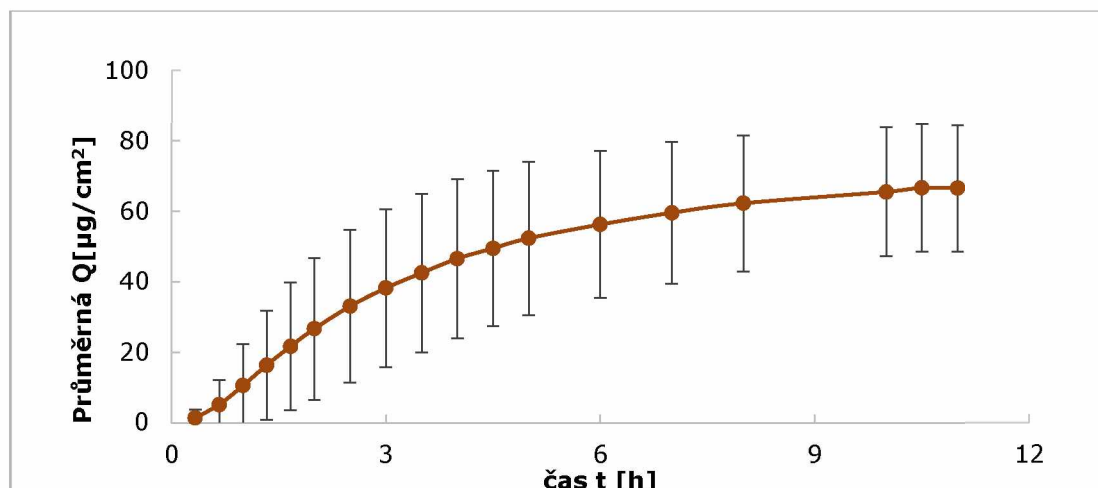
#### Testování 3: Penetrace kyseliny benzoové za použití komerční prasečí kůže

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze E a F. U cely č. 10 bylo zpozorováno lehké unikání receptorové kapaliny, z důvodu špatného umístění kožního modelu. Z důvodu pouze lehkého úniku kapaliny byla tato zcela započítána do celkového hodnocení. V tabulce č. 14 jsou hodnoty Fluxu, Lag time a vstřebání kyseliny benzoové pro jednotlivé difuzní cely. V grafu č. 4 je zobrazena absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q.

**Tabulka 14** – Hodnoty penetrace (komerční prasečí kůže 1)

FDC	Flux	Lag time	vstřebání
	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	[h]	[%]
1	44,248	0,00	40,00
2	28,858	0,47	44,44
3	27,121	0,21	39,44
4	17,921	0,90	32,22
5	7,596	1,10	16,11
6	11,986	0,42	27,22
7	35,057	0,30	41,67
8	4,631	1,47	12,78
9	8,353	1,17	21,67
10	12,262	1,32	30,56
<b>průměr</b>	<b>19,80</b>	<b>0,74</b>	<b>30,61</b>
<b>medián</b>	<b>15,09</b>	<b>0,68</b>	<b>31,39</b>
<b>SD</b>	<b>13,32</b>	<b>0,52</b>	<b>11,06</b>
<b>RSD</b>	<b>67,28</b>	<b>70,14</b>	<b>36,15</b>
<b>min</b>	<b>4,631</b>	<b>0,00</b>	<b>12,78</b>
<b>max</b>	<b>44,25</b>	<b>1,47</b>	<b>44,44</b>

**Graf 4** – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (komerční prasečí kůže1)



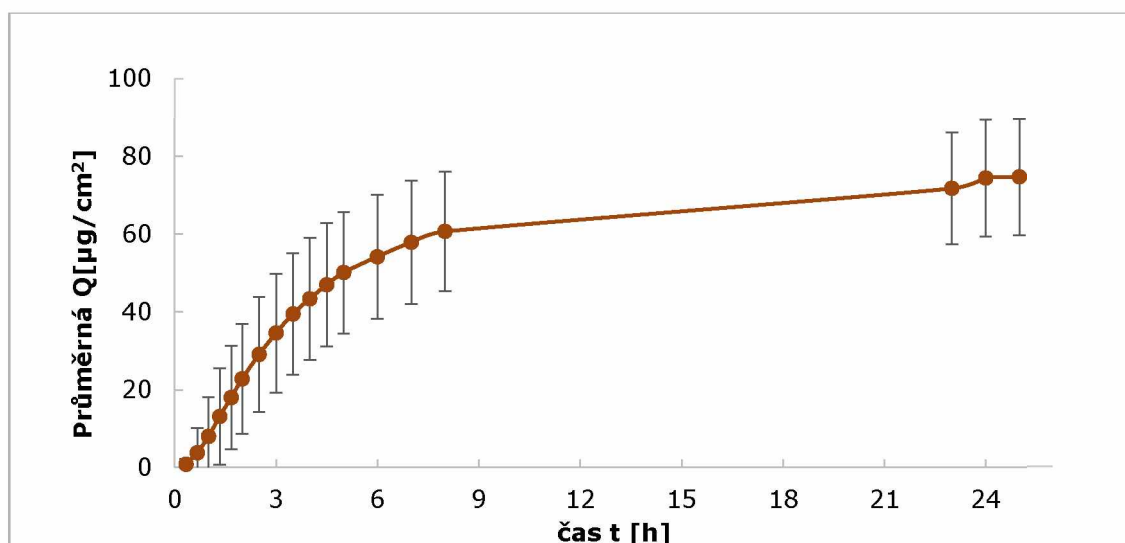
#### Testování 4: Penetrace kyseliny benzoové za použití komerční prasečí kůže

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze G a H. U cely č. 10 bylo zpozorováno unikání receptorové kapaliny, z důvodu špatného umístění kožního modelu. Tato cela č. 10 byla bez aplikace testované látky a nebyla započítána do celkového hodnocení. V tabulce č. 15 jsou hodnoty Fluxu, Lag time a vstřebání kyseliny benzoové pro jednotlivé difuzní cely. Tyto hodnoty byly spočítány pouze do 8. hodiny testování, z důvodu porovnání testování č. 3. V grafu č. 5 je zobrazena absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q.

**Tabulka 15 – Hodnoty penetrace (komerční prasečí kůže 2)**

FDC	Flux	Lag time	vstřebání
	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	[h]	[%]
1	22,148	0,76	82,22
2	15,414	0,96	84,44
3	30,916	0,10	81,11
4	7,989	1,32	54,44
5	22,253	0,05	62,78
6	13,083	1,31	82,78
7	7,206	1,04	48,33
8	23,793	0,77	90,56
<b>průměr</b>	<b>17,85</b>	<b>0,79</b>	<b>73,33</b>
<b>medián</b>	<b>18,78</b>	<b>0,87</b>	<b>81,67</b>
<b>SD</b>	<b>8,31</b>	<b>0,49</b>	<b>15,78</b>
<b>RSD</b>	<b>46,54</b>	<b>61,81</b>	<b>21,51</b>
<b>min</b>	<b>7,21</b>	<b>0,05</b>	<b>48,33</b>
<b>max</b>	<b>30,92</b>	<b>1,32</b>	<b>90,56</b>

**Graf 5 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (komerční prasečí kůže 2)**



### 3.6 Lidská kůže

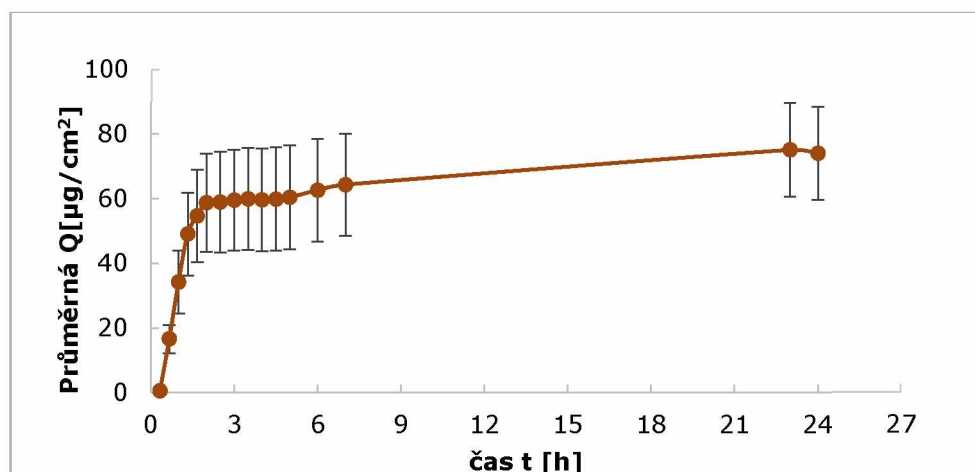
#### Testování 5: Penetrace kyseliny benzoové za použití lidské kůže

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze CH a I. U cely s číslem 3 docházelo během celého testování k úniku receptorové kapaliny, kdy tato cela nebyla započítána do celkového hodnocení. Penetrace kyseliny benzoové přes lidské kůže probíhala velmi rychle, kdy po třech hodinách penetrování byly dosaženy téměř maximální hodnoty kumulativního množství. Kyselina benzoová se objevila v receptorové kapalině už při prvním odběru po 20 minutách. V tabulce č. 16 jsou znázorněny hodnoty z průběhu penetrace a v grafu č. 6 je absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q.

**Tabulka 16 – Hodnoty penetrace (lidská kůže)**

FDC	Flux	Lag time	vstřebání
	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	[h]	[%]
1	71,440	0,40	61,61
2	54,244	0,40	72,73
4	61,895	0,38	63,41
5	24,820	0,00	40,55
6	82,763	0,42	77,39
7	23,022	0,05	75,42
8	42,444	0,24	80,40
9	80,312	0,46	94,20
<b>průměr</b>	<b>55,12</b>	<b>0,29</b>	<b>70,71</b>
<b>medián</b>	<b>58,07</b>	<b>0,39</b>	<b>74,08</b>
<b>SD</b>	<b>23,36</b>	<b>0,18</b>	<b>15,97</b>
<b>RSD</b>	<b>42,39</b>	<b>60,82</b>	<b>22,44</b>
<b>min</b>	<b>23,02</b>	<b>0,00</b>	<b>40,55</b>
<b>max</b>	<b>82,76</b>	<b>0,46</b>	<b>94,20</b>

**Graf 6 – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (lidská kůže)**



### 3.7 Strat-M membrána

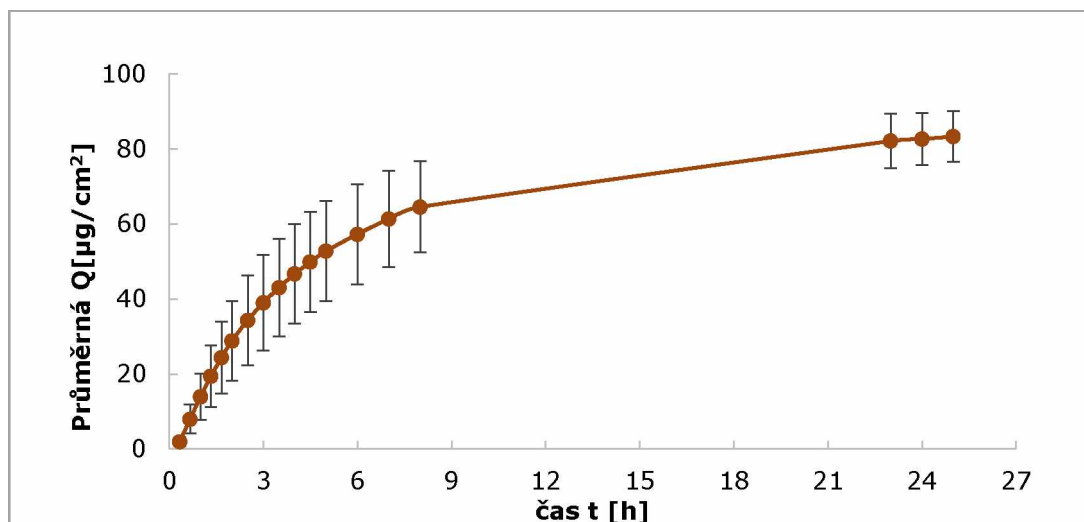
#### Testování 6: Penetrace kyseliny benzoové za použití Strat-M membrány

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze J a K. Během testování unikala receptorová kapalina z cely s č. 5 a 10. Cella s číslem 10 byla bez aplikované dávky. Cella s č. 5 nebyla započítána do celkového hodnocení. Penetrace kyseliny benzoové probíhala velmi rychle, kdy v odebraném vzorku po 20 minutách byla analyzována přítomnost kyseliny benzoové. Byly vypočítány hodnoty Fluxu, Lag time a vstřebání, které jsou znázorněny v tabulce č. 17. V grafu č. 7 je zobrazena absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q.

**Tabulka 17 –** Hodnoty penetrace (Strat-M membrány)

FDC	Flux	Lag time	vstřebání
	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	[h]	[%]
1	18,446	0,53	83,88
2	13,986	0,81	71,51
3	42,933	0,00	76,39
4	7,281	1,17	80,12
6	11,359	1,08	76,04
7	6,305	0,81	91,79
8	22,216	0,70	86,58
9	15,875	0,01	85,70
<b>průměr</b>	<b>17,30</b>	<b>0,64</b>	<b>81,50</b>
<b>medián</b>	<b>14,93</b>	<b>0,75</b>	<b>82,00</b>
<b>SD</b>	<b>11,66</b>	<b>0,44</b>	<b>6,68</b>
<b>RSD</b>	<b>67,41</b>	<b>68,91</b>	<b>8,21</b>
<b>min</b>	<b>6,31</b>	<b>0,00</b>	<b>71,51</b>
<b>max</b>	<b>42,93</b>	<b>1,17</b>	<b>91,79</b>

**Graf 7 –** Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (Strat-M membrány)





### 3.8 Prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete

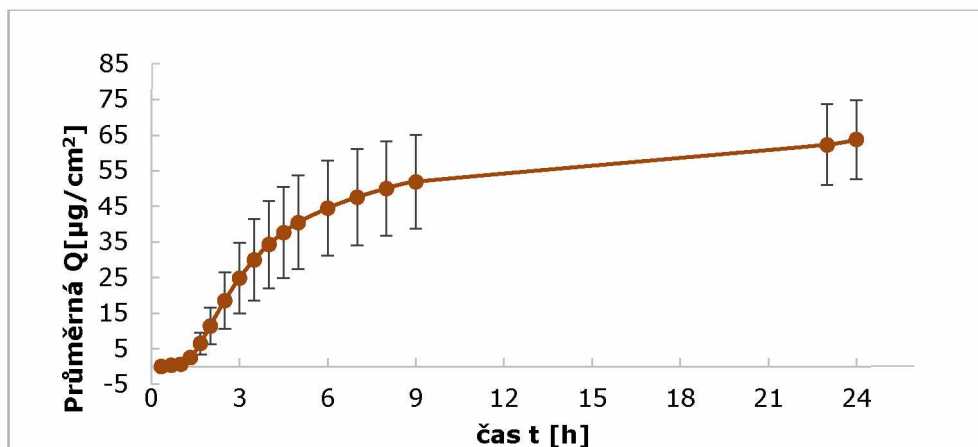
#### Testování 7: Penetrace kyseliny benzoové za použití prasečí kůže z domácího prasete

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze L a M. Během testování unikala receptorová kapalina z cely č. 10. Tato cela byla bez aplikované dávky, kdy neovlivnila celkové hodnocení. Práce s těmito modely kůže byla dobrá, v difuzní cele byly kromě 10. cely všechny dobře natažené. Kyselina benzoová se objevila v receptorové kapalině až při druhém odběru po 40 minutách. Absorpční křivka s průměrnými hodnotami kumulativního množství nebyla tolik strmá. V tabulce č. 18 jsou znázorněny hodnoty penetrace a v grafu č. 8 je absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q.

**Tabulka 18** – Hodnoty penetrace (prasečí kůže z domácího prasete)

FDC	Flux	Lag time	vstřebání
	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	[h]	[%]
1	11,445	0,75	55,00
2	22,580	1,10	68,89
3	6,887	1,04	48,89
4	5,287	0,33	51,67
5	7,912	1,05	56,11
6	9,934	1,05	71,67
7	9,496	1,01	56,67
8	8,788	0,48	73,89
9	18,627	1,33	82,22
<b>průměr</b>	<b>11,22</b>	<b>0,90</b>	<b>62,78</b>
<b>medián</b>	<b>9,50</b>	<b>1,04</b>	<b>56,67</b>
<b>SD</b>	<b>5,70</b>	<b>0,32</b>	<b>11,60</b>
<b>RSD</b>	<b>50,77</b>	<b>35,53</b>	<b>18,48</b>
<b>min</b>	<b>5,29</b>	<b>0,33</b>	<b>48,89</b>
<b>max</b>	<b>22,58</b>	<b>1,33</b>	<b>82,22</b>

**Graf 8** – Absorpční křivka s průměrnými hodnotami Q (prasečí kůže z domácího prasete)



## 4 DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo provést penetraci kyseliny benzoové různými kožními modely. Mezi použité kožní modely patřily prasečí kůže z ušních boltců, komerční prasečí kůže z ušních boltců, lidské kůže, Strat-M membrány a čerstvá prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete.

Testování kožní penetrace ovlivňují faktory, které mohou v určité míře ovlivnit výsledky testování. Mezi tyto faktory patří výběr a kvalita kůže, výběr typu difuzních cel, volba parametrů při testování, způsob vyhodnocení vzorků.

Při kožní penetraci byly využívány difuzní cely se šroubením. Tyto cely by měly zajistit nižší pravděpodobnost protékání receptorové kapaliny, nežli tomu je u difuzních cel s použitím kovové klemy. Touto problematikou se ve své diplomové práci z roku 2020 zabývala Bc. L. Bíšková, která ve své práci uvádí, že difuzní cely s kovovou klemou vykazují vyšší pravděpodobnost protékání receptorové kapaliny. Celkový souhrn výsledků je uveden v tabulce č. 19.

**Tabulka 19 – Celkový souhrn výsledků testování**

Pokus č.	Typ membrány	Flux		Lag time		Vstřebání	
		[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	RSD [%]	[h]	RSD [%]	[%]	RSD [%]
1	Prasečí tenká kůže	9,55	27,04	0,89	26,29	64,72	20,24
2	Prasečí silná kůže	4,38	30,62	1,83	30,79	56,18	22,70
3	Komerční kůže 1	19,80	67,28	0,74	70,14	30,61	36,15
4	Komerční kůže 2	17,85	46,54	0,79	61,81	73,33	21,51
5	Lidská kůže (dermatomovaná)	55,12	42,39	0,29	60,82	70,71	22,44
6	Strat-M membrána	17,30	67,42	0,64	68,92	81,50	8,23
7	Kůže z domácího prasete	11,22	50,77	0,90	35,53	62,78	18,48

Při prvním a druhém testování byly použity prasečí kožní modely o různé tloušťce. Obě testování byla rozdělena na tenké a silné kožní modely. Penetrace kyseliny benzoové probíhala rychleji při použití tenkých modelů kůže než u silnějších modelů kůže. Tomu odpovídaly i výsledky, kdy Flux u tenkých kůží odpovídal hodnotě  $9,55 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Tato hodnota Fluxu byla dvakrát vyšší nežli při použití silnějších kůží, kde Flux odpovídal hodnotě  $4,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Lag time byl při použití tenkých kožních modelů menší a to 0,89 hodin nežli u silnějších kůží, kde hodnota byla o 1 hodinu delší. Lag time při použití silnějších kožních modelů byl 1,83 hodin. Relativní směrodatná odchylka byla poměrně nízká, u tenkých kožních modelů byla RSD u

Fluxu 27,04 % a u Lag time 26,29 %. U silnějších kožních modelů byla RSD lehce vyšší nežli u prvního testování, a to u Fluxu 30,62 % a u Lag time 30,79 %. Kyselina benzoová v receptorové kapalině u obou testování byla přítomna již při prvním odběru, avšak tato koncentrace kyseliny benzoové při použití tenkých kožních modelů zůstávala po dobu 40 minut a při použití silnějších modelů 60 minut téměř podobná. Při pohledu na absorpční křivky lze vyhodnotit, že tloušťka kožních modelů má přímý vliv na strmost této křivky, která ovlivňuje výsledné hodnoty Fluxu a Lag time. Při použití tenčích kožních modelů byla tato absorpční křivka strmější, nežli tomu bylo při použití silnějších kožních modelů. Díky tomu tedy lze říci, že tloušťka kožních modelů ovlivňuje průběh penetrace testovaných látek, což potvrzuje i J.J.M. van de Sandt a kol. ve své publikaci z roku 2004.

Při třetím a čtvrtém testování byly použity komerční prasečí kůže. Tyto kůže by měly vykazovat nízkou variabilitu ve vzhledu a vlastnostech. Použité kožní modely byly při vizuálním srovnání rozdílné. Tloušťka těchto kůží se pohybovala v rozmezí 910–2686  $\mu\text{m}$ . Některé kůže obsahovaly žilky, které mohou ovlivnit průběh penetrace testované látky. Průměrná hodnota Fluxu byla u třetího testování 19,80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a u čtvrtého testování 17,85  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Průměrná hodnota Lag time byla u třetího testování 0,74 hodin a u čtvrtého testování 0,79 hodin. Relativní směrodatná odchylka byla poměrně vysoká. Nejvyšší RSD byla u třetího testování u Lag time a to 70,14 % a u Fluxu 67,28 %. Nižší RSD byla u čtvrtého testování, kdy tato hodnota odpovídala u Lag time 61,81 % a u Fluxu 46,54 %. Vysoké RSD mohlo být zapříčiněné různou tloušťkou kožních modelů, nebo přítomností žilek v kožních modelech. S porovnáním prasečích kůží z prvního a druhého testování vykazují vyšší RSD právě komerční prasečí kůže, u kterých by se očekávalo, že budou vykazovat nižší hodnoty RSD.

Páté testování kožní penetrace probíhalo za použití dermatomovaných lidských kožních modelů. U těchto kůží probíhala kožní penetrace velmi rychle. Ze všech použitých kožních modelů vykazovala lidská kůže nejvyšší Flux a to 55,12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a nejnižší hodnotu Lag time a to 0,29 hodin. RSD byla u Fluxu 42,39 % a u Lag time 60,82 %. Vzhledem k velké tenkosti dermatované kůže, probíhala penetrace pochopitelně rychleji. Dále výsledky penetrace mohly být ovlivněny věkem dárce a jeho pohlavím. Zde bylo využito 7 lidských kůží od ženského dárce a 3 lidské kůže od mužského dárce. Lidské kožní modely od mužského dárce obsahovaly větší množství chlupů, které mohly urychlit průběh penetrace kyseliny benzoové. Při použití modelů od mužského dárce byly při prvním odběru hodnoty kumulativního množství dvojnásobné nežli v porovnání s modely ženských dárců.

**Tabulka 20** – Porovnání hodnot lidské kůže s publikací van de Sandt a kol. [53]

	Publikace van de Sandt a kol.	Vlastní data lidská kůže
Flux [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]	16,54	55,12
SD	11,87	23,36
RSD [%]	6,3 - 52,2	42,39
Vstřebání po 24 hodin [%]	70,6	70,71
SD	17,2	15,97
RSD [%]	1,6 - 57,1	22,44
Lag time [h]	1,15	0,29
SD	0,89	0,18
RSD [%]	6,9 - 173,2	60,82

V porovnání s výsledky publikace od van de Sandt a kol. bylo vstřebání kyseliny benzoové po 24 hodinách testování kožní penetrace velmi podobné. V publikaci je uvedena hodnota vstřebání kyseliny benzoové 70,6 % a v mé práci hodnota vstřebání kyseliny benzoové byla 70,71 % (tabulka č. 19).

Šesté testování bylo prováděno za použití Strat-M membrány. Hodnota průměrného Lag time odpovídala 0,64 hodin. Penetrace probíhala poměrně rychle a kyselina benzoová byla již přítomna po 20minutovém odběru vzorku. Hodnota průměrného Fluxu byla  $17,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ .

**Tabulka 21** – Porovnání hodnot Strat-M membrán s diplomovou prací Bc. Bíškové [28]

	Publikace Bc. Bíšková 2020	Vlastní data Strat-M membrány
Flux	16,4	17,30
SD	6	11,66
Lag time	0,14	0,64
SD	0,06	0,44

V porovnání s výsledky diplomové práce Bc. Bíškové, vychází průměrná hodnota Fluxu velmi podobně (tabulka č. 20). Hodnota Lag time v diplomové práci vychází 0,14 hodin a v mé práci hodnota Lag time byla 0,64 hodin. Rozdíly v hodnotách mohou být způsobené rozdílnou rychlostí míchání receptorové kapaliny, kdy Bc. Bíšková použila rychlost míchání 600 rpm,

zatímco v mé práci byla použita rychlost míchání 400 rpm.

Sedmé testování bylo prováděno za použití prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete. Tato kůže byla oproti ostatním čerstvá. Dlouhodobé zamražení kůže by mohlo mít vliv na výsledný průběh penetrace kyseliny benzoové. Průměrná hodnota Lag time byla poměrně vysoká a to 0,90 hodin. Průměrná hodnota Fluxu byla 11,22  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . V porovnání s prasečími kožními modely z prvního testování se jedná o velmi podobné výsledky, kdy Lag time vycházel 0,89 hodin a Flux 9,55  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Hodnoty Fluxu a Lag time vychází lehce vyšší u použitých čerstvých kožních modelů, nežli tomu bylo u starších kožních modelů. V porovnání s komerčními prasečími kožními modely vychází hodnoty Lag time a Fluxu nižší při použití čerstvých kožních modelů.

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části byla zpracována literární rešerše na téma *in vitro* test kožní penetrace se zaměřením na kožní modely. Byla popsána metoda *in vitro*, a jaké má výhody oproti metodě *in vivo*. *In vitro* metoda je regulována směrnicí OECD 428, která popisuje metody pro hodnocení absorpce pomocí lidské a zvířecí kůže. Dále byl definován pojem transdermální absorpce a způsoby průchodu chemických látek do vnitřního prostředí organismu. Byly popsány kožní modely, způsoby jejich skladování a jejich výhody a nevýhody pro použití k testování kožní penetrace. Hlavním komponentem testování kožních penetrací jsou difuzní cely, ve kterých probíhá celý tento proces. Testování kožní penetrace je závislé na několika faktorech, mezi které se řadí teplota a rychlost míchání receptorového média, výběr modelu kůže a receptorové kapaliny, způsob aplikování testované dávky a odebírání vzorků. Dále byly popsány referenční chemikálie, mezi které patří kyselina benzoová, testosteron a kofein s rozdílnou polaritou. Tyto referenční chemikálie jsou doporučovány OECD, jelikož je možné výsledky porovnávat s publikacemi a jinými laboratořemi. Analýza vzorků probíhá nejčastěji pomocí HPLC.

Experimentální část byla zaměřena na porovnání průběhu penetrace kyseliny benzoové za použití různých modelů kůže. Mezi použité modely kůže patřily prasečí kůže z ušních boltců, komerční prasečí kůže z ušních boltců, lidské kůže, syntetické membrány a čerstvá prasečí kůže z ušních boltců domácího prasete. Testování kožní penetrace bylo prováděno za využití vertikálních difuzních šroubovacích statických cel za přesně definovaných podmínek.

S porovnáním všech použitých kůží vykazovala nejvyšší průměrnou hodnotu Fluxu lidská kůže a to  $55,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Důvodem mohlo být to, že lidské kůže byly na rozdíl od ostatních kůží dermatomované. Lidská kůže vykazovala naopak nejnižší průměrnou hodnotu Lag time a to 0,29 hodin. Nejnižší průměrnou hodnotu Fluxu vykazovaly prasečí silné kůže z ušních boltců, jehož hodnota odpovídala  $4,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Důvodem nízkého Fluxu mohla být tloušťka kožních modelů. Prasečí silné kůže z ušních boltců vykazovaly nejvyšší hodnotu Lag time a to 1,83 hodin. Nejvyšší procento vstřebání kyseliny benzoové bylo u Strat-M membrány a to 81,50 %, naopak nízká hodnota vstřebání kyseliny benzoové byla u komerční prasečí kůže z testování 3 a to 30,61 %. Nejvyšší hodnoty RSD byly u komerčních prasečích kůží a u Strat-M membrány. U komerčních prasečích kůží a Strat-M membrán byla očekávána nízká hodnota RSD. Nejnižší hodnoty RSD byly u prasečích kůží z prvního a druhého testování.

Výhodou prasečí kůže je její dostupnost, v porovnání s lidskou kůží. Nejlepší alternativou lidské kůže je ta prasečí, která má nejpodobnější morfologické vlastnosti. U komerčních prasečích kůží a Strat-M membrán je ta výhoda, že modely kůží a membrán jsou připraveny ve formě tzv. disků, které se nemusí upravovat před samotným testováním. Avšak tyto vyražené disky komerčních kůží jsou určeny pro difuzní cely s kovovou klemou, zatímco u šroubovacích cel musí přesně zapadnout, takže bylo nutné kožní modely lehce upravit. Lidské kůže byly rovněž připraveny ve formě tzv. disků, avšak byly velmi tenké a práce s nimi proto velmi obtížná. Tento problém byl i u tenkých prasečích kůží. Další nevýhodou lidské kůže je její dostupnost a cena. Výhoda u prasečí kůže z domácího prasete byla cena a možnost výběru z více kožních modelů podobné tloušťky. Další výhodou byla krátká doba skladování kůží v porovnání s ostatními kožními modely, jelikož doba skladování může ovlivnit průběh penetrace. Obecnou nevýhodou všech kožních modelů byla přítomnost ochlupení, které mohlo urychlit penetraci kyseliny benzoové. V porovnání všech výhod a nevýhod použitých kožních modelů pro *in vitro* testování kožní penetrace, se pro účely této práce ukázala jako nejlepší kůže z ušních boltců prasete domácího.

Přínosem této diplomové práce je porovnání výhod a nevýhod použitých kožních modelů pro kožní penetraci, pozornost byla zaměřena na jejich skladování, přípravu a průběh penetrace kyseliny benzoové kůží při zvolených podmínkách. Rovněž byly zmíněny problémy vznikající během testování, které by mohly být eliminovány pro budoucí měření.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

1. KUBINCOVÁ, Petra, Jiří NOVÁK a Iva SOVADINOVÁ. *Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity*. [online] Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2016. Chem. Listy 110, 118–125 s. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016\\_02\\_118-125.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_02_118-125.pdf)
2. BAKAND, Shahzan, Chris WINDER a Christian KHALIL. *Toxicity Assessment of Industrial Chemicals and Airborne Contaminants: Transition from In Vivo to In Vitro Test Methods* [online]. 2008. 775-787 s. Ročník 17, Číslo 13. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08958370500225240>
3. GUTH, Katharina, Monika SCHÄFER-KÖRTING a Eric FABIAN a kol. *Toxicology in Vitro: Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro* [online]. 2015. 113-123 s. Ročník 29, Číslo 1. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233314001714#!>
4. EISENBRAND, Gerhard, Beatrice POOL-ZOBEL, Valerie BAKER a kol. *Food and Chemical Toxicology.: Methods of in vitro toxicology* [online]. 2002. 193-236 s. Ročník 40, Číslo 2–3. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691501001181>
5. KOTINGOVÁ, Lenka. *Kinetika vybraných látek při dermální expozici: Polycyklické aromatické uhlovodíky* [online]. Hradec Králové, 2015. Disertační práce. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/111366053-Kinetika-vybranych-latek-pri-dermalni-expozici-polycyklicke-aromaticke-uhlovodiky.html>
6. ALBRECHTOVÁ, Barbara. *In vitro metody a jejich relevance vůči situaci in vivo: Nové trendy v experimentech s tkáňovými kulturami*. Brno, 2013. 50 s. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita. Vedoucí práce Mgr. Jiří Novák, Ph.D.
7. SCHÄFER-KÖRTING, Monika, Udo BOCK, Armin GAMER a kol. *Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing* [online]. 2006. 283-294 s. Ročník 34, Číslo 3 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119290603400312>
8. OECD. *OECD Series on Testing and Assessment Guidance Document on Good In Vitro Method Practices*. 2018. 206 s. [cit. 2022-02-27]. ISBN 9264304797, 9789264304796.
9. JDAVIES, Diane, Jon R HEYLINGS, Heather GAYES a kol. *Further development of an in vitro model for studying the penetration of chemicals through compromised skin* [online]. 2016. 101-107 s. Ročník 38 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z:



- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233316302119>
10. OECD. *OECD: Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj* [online]. 2007 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.oecd.org/general/38406764.pdf>
  11. HOPFPHD B, Nancy, Catherine CHAMPMARTIN, Linda SHENK a kol. *Reflections on the OECD guidelines for in vitro skin absorption studies* [online]. 2008. Ročník 117 [cit. 2022-02-27]. ISBN 104752. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230020301781#!>
  12. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dermal absorption* [online]. 2006. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc235.pdf>
  13. EUROPEAN COMMISSIONS. *Scientific committee on consumer safety: Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients* [online]. 2010 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_s\\_002.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf)
  14. DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika*. Grada Publishing a.s, 2006. 219 s. ISBN 8024714647, 9788024714646.
  15. VLACHYNSKÁ, Lenka. *Stanovení transdermální absorpce kosmetických emulzí in vitro* [online]. Zlín, 2017. 100 s. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce Doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.
  16. KOTINGOVÁ, Lenka, Lenka BORSKÁ a Zdeněk FIALA. *Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro* [online]. Univerzita Karlova v Praze, 2008. Chem. Listy 103, 533–539 s. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_07\\_533-539.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf)
  17. NAFISI, Shohreh, Monika SCHAFFER-KORTING, Howard I MAIBACH. *Measuring Silica Nanoparticles in the Skin*. 2017. 325-332 s. Ročník 550, Číslo 1–2. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-32383-1\_44
  18. NIELSEN BO, Jesper, Fleming NIELSON a Jeans AHM SORENSEN. *In Vitro Percutaneous Penetration of Five Pesticides The Annals of Occupational Hygiene* [online]. 2004. 697-705 s. Ročník 48, Číslo 8. [cit. 2020-01-08]. DOI: 10.1093/ Dostupné z: <https://academic.oup.com/annweh/article/48/8/697/139722>
  19. DAVIES J., Diane, John R. HEYLINGS, Timothy J. McCARTHY a kol. *Toxicology in Vitro* [online]. 2015. 176-181 s. Ročník 29, Číslo 1. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233314001854>
  20. ŠVIHOVEC, Jan a kol. *Farmakologie*. Grada Publishing a.s, 2018. ISBN 8024755580,

9788024755588.

21. CHILCOTT, Robert a Shirley PRICE. *Principles and Practice of Skin Toxicology*. 2008. 177-192 s. ISBN 9780470773093.
22. WHO. *Environmental Health Criteria 235 - Dermal Absorption* [online]. 2006 [cit. 2019-12-05]. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf>
23. DVOŘÁKOVÁ, Tereza. *Stanovení permeace vybraných látek přes kůži in vitro s využitím statických cel Franzova typu*. Hradec Králové, 2015. 65 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Kateřina Vávrová.
24. GHAFOURIAN, Taravat, Eleftherios G. SAMARAS, James D. BROOKS a kol. *Validated models for predicting skin penetration from different vehicles*. [online]. 2010. 612-616 s. Ročník 41, Číslo 5. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092809871000312X#!>
25. MONTAGNA, William. *The Structure and Function of Skin*. Elsevier, vydání 3, 2012, 448 s. [cit. 2022-02-27]. ISBN 0323138691, 9780323138697.
26. DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Grada Publishing a.s, 2009, 532 s. ISBN 8024732408, 9788024732404.
27. JOHN, F a G EBLING. *Human skin: anatomy* [online]. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/human-skin>
28. BÍŠKOVÁ, Lucie. *In vitro kožní penetrace: Vývoj testovací metody*. Pardubice, 2020. 95 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.
29. GHOSH, Tapash. *Dermal Drug Delivery: From Innovation to Production*. CRC Press, 2020, 461 s. [cit. 2022-02-27]. ISBN 1315356643, 9781315356648.
30. SHIOW-FERN, Ng a Jennifer J. ROUSE, Francis D. SANDERSON a kol. *Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies* [online]. 2010. 1432–1441 s [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-010-9522-9>
31. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. HAQ, Anika a Benjamin GOODYEAR. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, s. 432-437 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517318304113#!>
32. BARBERO, Ana M. a Frederick H. FRASCH. *Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review*. [online]. 2009. 1-13 s. Ročník 23, Číslo 1. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233308002658>

33. NIELSEN BO, Jesper, Inés PLASENCIA, Jeans AHM SORENSEN a kol. *Skin Pharmacology and Physiology: Storage Conditions of Skin Affect Tissue Structure and Subsequent in vitro Percutaneous Penetration* [online]. 2011. 93-102 s. Ročník 24, Číslo 2. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.1159/000322304
34. BARBERO, Ana M. a Frederick H. FRASCH. *Skin Pharmacology and Physiology: Effect of Frozen Human Epidermis Storage Duration and Cryoprotectant on Barrier Function Using Two Model Compounds* [online]. 2016. Ročník 29, Číslo 1. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.1159/000441038
35. HUBKA, Tomáš. *In vitro test kožní penetrace jako alternativní test toxicity* [online]. Pardubice, 2017. 65 s. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.
36. OSTROVSKÁ, Lucie. *Stanovení permeace kofeinu přes kůži in vitro s využitím statických difuzních cel franzova typu*. Hradec králové, 2013. 63 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.
37. TSAI, Ming-Jun a Yaw-Syan FU. *Modified Franz diffusion cell* [online]. 2014 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [https://figshare.com/articles/figure/Modified\\_Franz\\_diffusion\\_cell\\_/1120086](https://figshare.com/articles/figure/Modified_Franz_diffusion_cell_/1120086)
38. OECD. *Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. [online]. Paříž, 2004. Sekce 4. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264071087-en>.
39. MÁLKOVÁ, Andrea a Lenka KOTINGOVÁ, Roman KANĎÁR a kol. *Trans-epidermal absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons* [online]. Univerzita Karlova, 2018. 76-83 s. Ročník 63. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: doi:10.21101
40. OECD. *Guidance notes on dermal absorption.: OECD Environment, Health and Safety Publications* [online]. 2011. 72 s. Ročník 36. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>
41. HMDB. *Showing metabocard for Hippuric acid (HMDB0000714)* [online]. 2020. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000714>
42. PUBCHEM. *Benzoic acid. National Library of Medicine* [online]. 2004. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/243>
43. EUROPEAN COMMISSION. *Scientific committee on consumer products SCCP: Benzoic Acid and Sodium Benzoate* [online]. 2005 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_015](https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_015).

pdf

44. ATTIA, Dalia AbdelRhman. *In Vitro and in Vivo evaluation of transdermal absorption of naproxen sodium* [online]. 2009. 2154-2165 s. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/228624012\\_In\\_Vitro\\_and\\_in\\_Vivo\\_evaluation\\_of\\_transdermal\\_absorption\\_of\\_naproxen\\_sodium](https://www.researchgate.net/publication/228624012_In_Vitro_and_in_Vivo_evaluation_of_transdermal_absorption_of_naproxen_sodium)
45. HPLC. *Teorie HPLC / Základy HPLC* [online]. 2020. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
46. SVOBODOVÁ, Iva. *HPLC analýza aromatických látek odvozených od antrachinonu v třezalce tečkové* [online]. Hradec Králové, 2018. 78 s. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králové. Vedoucí práce Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.
47. LAU, Wing Man a Keng Woi NG. *Finite and Infinite Dosing: Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin* [online]. 2017. 35-44 s. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-53270-6\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-53270-6_3)
48. HPLC. *UV/VIS HPLC detektory. HPLC* [online]. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/UV\\_VIS\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html)
49. HPST. *HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie – základy a principy*. [online]. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://hpst.cz/hplc-vysokoucinnna-kapalinova-chromatografie-zaklady-principy#>
50. ŠELEŠOVSKÁ, Renáta, Lenka BANDŽUCHOVÁ a Jaromíra CHÝLKOVÁ. *Ekoanalýza II.* Pardubice: Univerzita Pardubice, 2013. 268 s. ISBN 978-80-7395-633-2.
51. KROMIDAS, Stavros. *Optimization in HPLC: Concepts and Strategies* [online]. John Wiley & Son, 2021. 416 s. [cit. 2022-02-27]. ISBN 3527347895, 9783527347896. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=WQM7EAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=HPLC&hl=cs&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=HPLC&f=false](https://books.google.cz/books?id=WQM7EAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=HPLC&hl=cs&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=HPLC&f=false)
52. WIKIPEDIA. *Schéma HPLC* [online]. 2010 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative\\_HPLC.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative_HPLC.svg)
53. VAN DE SANDT, J.J.M., J.A. VAN BURGSTEDEN, S. CAGE a kol. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi- centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2004. 271-281 s. Ročník 39, Číslo 3. [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230004000145?via%3Dihub>

## **7 PŘÍLOHY**

*Příloha A – Testování 1: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Prasečí tenká kůže)*

*Příloha B – Testování 1: Graf popisující průběh penetrace (Prasečí tenká kůže)*

*Příloha C – Testování 2: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Prasečí silné kůže)*

*Příloha D – Testování 2: Graf popisující průběh penetrace (Prasečí silné kůže)*

*Příloha E – Testování 3: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Komerční prasečí kůže 1)*

*Příloha F – Testování 3: Graf popisující průběh penetrace (Komerční prasečí kůže 1)*

*Příloha G – Testování 4: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Komerční prasečí kůže 2)*

*Příloha H – Testování 4: Graf popisující průběh penetrace (Komerční prasečí kůže 2)*

*Příloha CH – Testování 5: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Lidská kůže)*

*Příloha I – Testování 5: Graf popisující průběh penetrace (Lidská kůže)*

*Příloha J – Testování 6: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Strat-M membrána)*

*Příloha K – Testování 6: Graf popisující průběh penetrace (Strat-M membrána)*

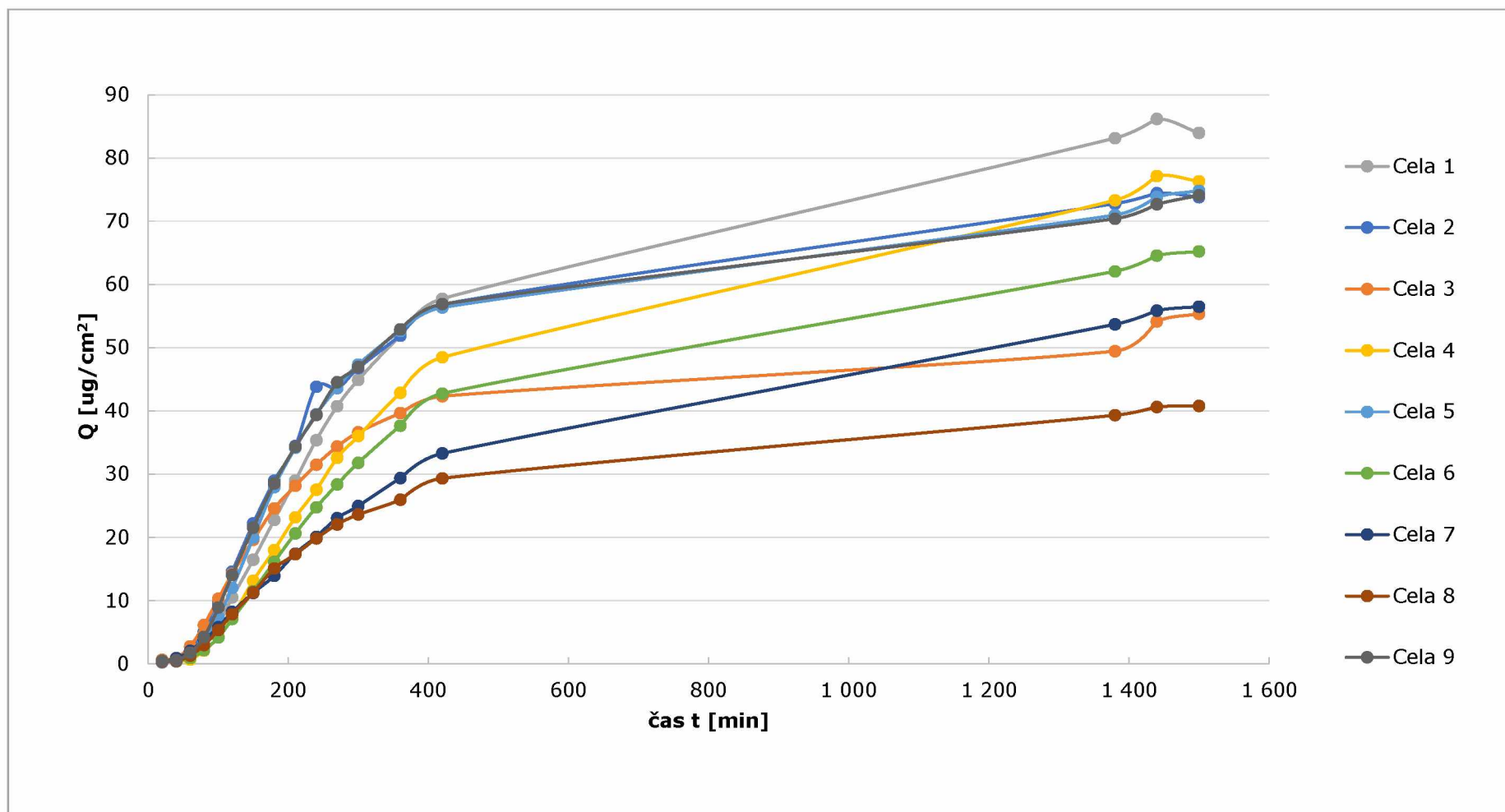
*Příloha L – Testování 7: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Prasečí kůže z domácího prasete)*

*Příloha M – Testování 7: Graf popisující průběh penetrace (Prasečí kůže z domácího prasete))*

*Příloha A – Testování 1: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Prasečí tenká kůže)*

Cela č.	Kumulativní množství Q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]																	Lag time	Flux
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
čas [h]	0,33	0,67	1,00	1,33	1,67	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	6,00	7,00	23,00	24,00	25,00		
čas [min]	20	40	60	80	100	120	150	180	210	240	270	300	360	420	1 380	1 440	1 500		
1	0,2	0,4	1,2	4	6,3	10,5	16,5	22,7	29,0	35,4	40,8	44,9	51,9	57,7	83,2	86,2	84,0	1,09	11,66
2	0,41	0,7	2,0	5,1	9,6	14,6	22,2	29,0	34,4	43,8	43,6	46,8	51,9	56,9	72,8	74,4	73,8	0,79	12,48
3	0,62	0,93	2,8	6,1	10,3	14,2	19,6	24,6	28,1	31,5	34,3	36,6	39,7	42,3	49,5	54,1	55,4	0,55	9,55
4	0,30	0,4	0,7	2,1	4,2	7,4	13,1	18,0	23,2	27,5	32,6	36,0	42,8	48,5	73,3	77,1	76,3	1,19	9,53
5	0,31	0,4	1,2	3,5	7,4	12,0	19,9	28,0	34,2	39,5	43,7	47,3	52,6	56,4	71,0	73,8	74,8	0,99	12,81
6	0,48	0,5	0,9	2,2	4,2	7,1	11,5	16,1	20,6	24,8	28,4	31,8	37,6	42,8	62,1	64,6	65,2	1,15	8,40
7	0,36	0,9	2,0	3,8	5,8	8,2	11,2	13,9	17,4	20,1	23,1	25,0	29,4	33,3	53,7	55,9	56,5	0,64	5,89
8	0,39	0,4	1,3	3,0	5,3	7,9	11,3	15,1	17,3	19,8	22,1	23,6	25,9	29,3	39,3	40,6	40,8	0,65	5,86
9	0,47	0,6	1,8	4,3	8,9	14,1	21,6	28,5	34,3	39,4	44,5	47,0	52,9	56,9	70,4	72,7	74,1	0,88	12,69
<b>Průměr</b>	0,39	0,57	1,48	3,57	6,55	10,17	15,59	20,87	25,52	29,74	33,67	36,53	41,61	45,89	62,80	65,62	65,87	<b>0,89</b>	<b>9,55</b>
<b>Medián</b>	0,4	0,5	1,3	3,6	6,0	9,4	14,8	20,4	25,7	29,5	33,5	36,3	41,2	45,6	66,2	68,6	69,6	0,93	9,54
<b>SD</b>	0,1	0,2	0,6	1,2	2,1	2,8	4,1	5,5	6,5	7,4	8,3	8,8	9,8	10,2	13,5	13,8	13,3	0,24	2,58
<b>RSD %</b>	30,8	36,2	42,8	33,8	31,4	27,3	26,0	26,2	25,3	25,0	24,5	24,1	23,6	22,2	21,5	21,0	20,2	<b>26,29</b>	<b>27,04</b>

*Příloha B – Testování 1: Graf popisující průběh penetrace (Prasečí tenká kůže)*

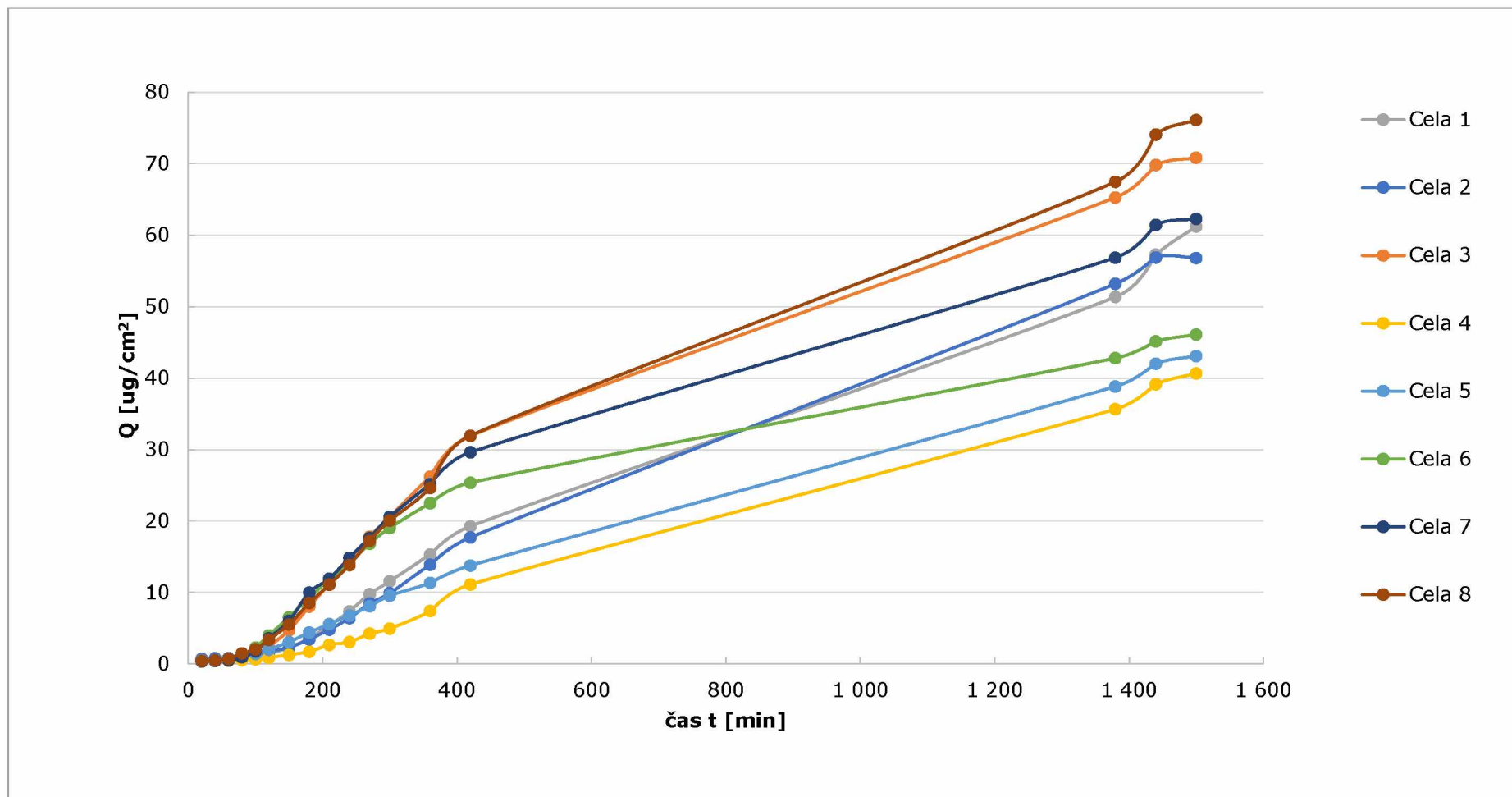


*Příloha C – Testování 2: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Prasečí silné kůže)*

Cela č.	Kumulativní množství Q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]																	Lag time	Flux
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
čas [h]	0,33	0,67	1,00	1,33	1,67	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	6,00	7,00	23,00	24,00	25,00	[h]	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]
čas [min]	20	40	60	80	100	120	150	180	210	240	270	300	360	420	1 380	1 440	1 500		
1	0,4	0,4	0,5	1	1,2	1,4	2,3	3,6	5,4	7,4	9,8	11,6	15,3	19,3	51,3	57,3	61,2	2,13	3,82
2	0,71	0,8	0,8	1,1	1,3	1,7	2,3	3,4	4,8	6,4	8,5	9,9	13,9	17,7	53,2	56,9	56,8	2,38	3,76
3	0,42	0,54	0,6	0,7	1,3	2,4	4,7	8,0	11,2	14,4	17,8	20,5	26,2	31,9	65,3	69,8	70,8	1,85	6,39
4	0,40	0,4	0,5	0,5	0,7	0,9	1,3	1,7	2,7	3,1	4,2	4,9	7,4	11,1	35,6	39,1	40,6	2,79	2,31
5	0,50	0,5	0,7	0,9	1,4	2,0	3,1	4,4	5,6	6,8	8,1	9,5	11,3	13,8	38,8	42,0	43,1	1,24	2,39
6	0,46	0,5	0,6	1,2	2,3	4,0	6,5	9,2	11,8	14,1	16,8	19,0	22,5	25,4	42,8	45,1	46,1	1,16	4,83
7	0,35	0,4	0,5	0,9	1,8	3,6	6,0	10,0	11,9	14,9	17,6	20,6	25,2	29,6	56,9	61,4	62,3	1,43	5,59
8	0,41	0,5	0,7	1,5	2,0	3,4	5,5	8,5	11,1	13,8	17,2	20,0	24,6	31,9	67,5	74,1	76,1	1,68	5,91
<b>Průměr</b>	0,45	0,5	0,6	0,9	1,5	2,4	4,0	6,1	8,1	10,1	12,5	14,5	18,3	22,6	51,4	55,7	57,1	<b>1,83</b>	<b>4,38</b>
<b>Medián</b>	0,42	0,50	0,6	0,9	1,3	2,2	3,9	6,2	8,3	10,6	13,3	15,3	18,9	22,3	52,3	57,1	59,0	1,77	4,33
<b>SD</b>	0,1	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	2,0	3,2	3,8	4,7	5,4	6,2	7,2	8,2	11,7	12,8	13,0	0,59	1,49
<b>RSD %</b>	24,8	22,3	21,5	34,5	35,6	46,0	49,9	51,8	47,3	46,3	43,5	42,8	39,3	36,5	22,8	23,0	22,7	<b>30,79</b>	<b>30,62</b>



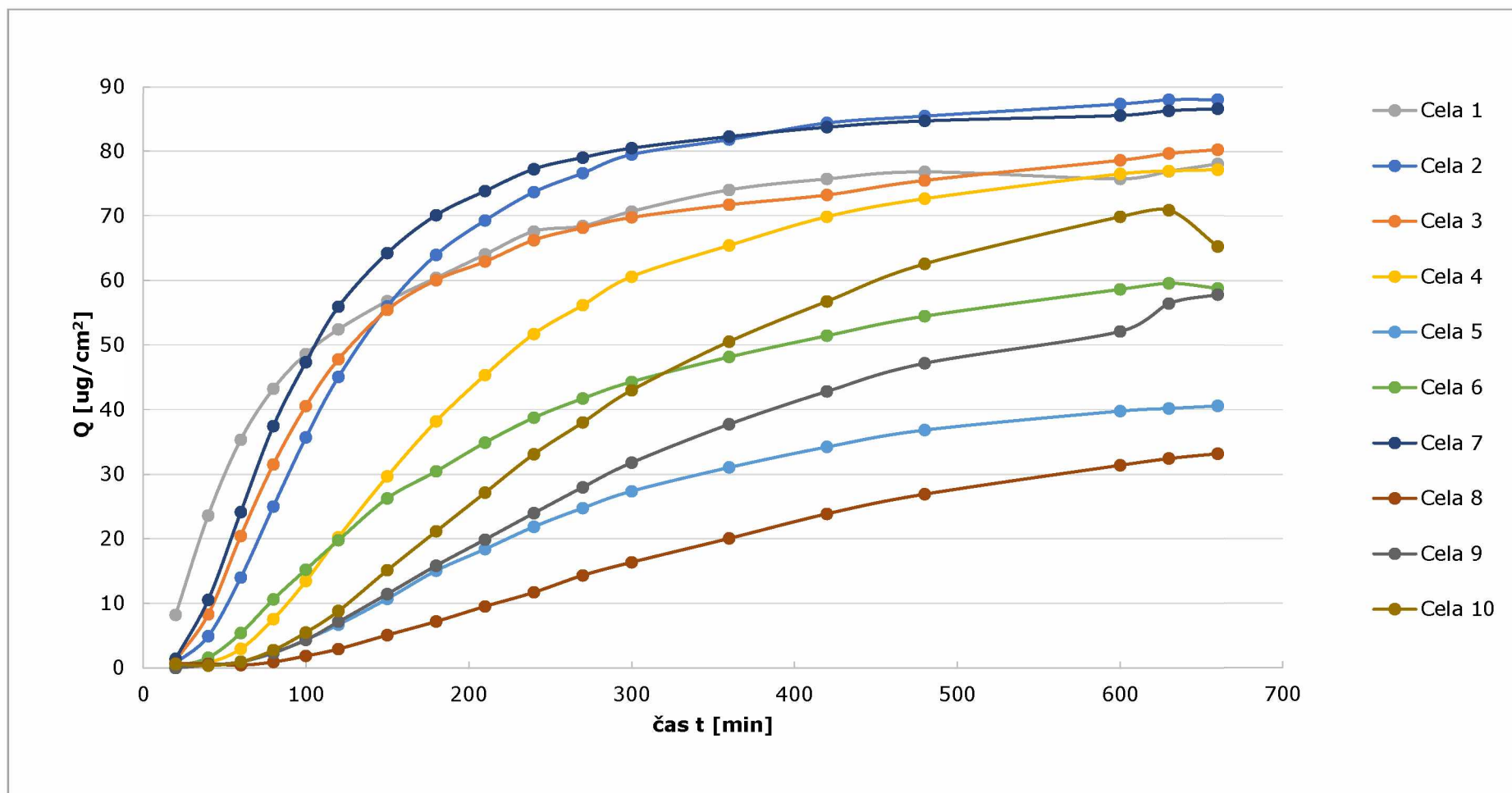
*Příloha D – Testování 2: Graf popisující průběh penetrace (Prasečí silné kůže)*



*Příloha E – Testování 3: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Komerční prasečí kůže 1)*

Cela č.	Kumulativní množství Q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]																		Lag time	Flux
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
čas [h]	0,33	0,67	1,00	1,33	1,67	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	6,00	7,00	8,00	10,00	10,50	11,00	[h]	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]
čas [min]	20	40	60	80	100	120	150	180	210	240	270	300	360	420	480	600	630	660		
1	8,2	23,6	35,3	43	48,6	52,4	56,8	60,4	64,0	67,5	68,4	70,6	74,0	75,7	76,8	75,7	76,9	78,0	0,00	44,25
2	0,77	4,9	14,0	25,0	35,7	45,0	55,9	63,9	69,2	73,6	76,6	79,4	81,7	84,3	85,4	87,3	87,9	87,9	0,47	28,86
3	1,19	8,29	20,4	31,5	40,5	47,7	55,4	60,0	62,9	66,2	68,1	69,7	71,7	73,2	75,4	78,5	79,6	80,2	0,21	27,12
4	0,47	0,8	3,0	7,6	13,5	20,2	29,7	38,2	45,3	51,7	56,1	60,5	65,4	69,8	72,6	76,4	76,9	77,1	0,90	17,92
5	0,37	0,5	1,0	2,3	4,4	6,7	10,7	15,1	18,4	21,9	24,7	27,4	31,0	34,2	36,8	39,7	40,2	40,5	1,10	7,60
6	0,29	1,6	5,4	10,6	15,2	19,8	26,3	30,4	34,9	38,7	41,7	44,3	48,1	51,4	54,4	58,6	59,5	58,7	0,42	11,99
7	1,43	10,5	24,1	37,4	47,3	55,9	64,2	70,1	73,8	77,2	79,0	80,4	82,2	83,7	84,6	85,5	86,2	86,5	0,30	35,06
8	0,71	0,7	0,4	0,9	1,9	2,9	5,1	7,2	9,5	11,7	14,3	16,4	20,1	23,9	26,9	31,4	32,4	33,2	1,47	4,63
9	0,00	0,5	0,9	2,4	4,3	7,2	11,4	15,8	19,9	24,0	28,0	31,8	37,7	42,8	47,1	52,1	56,4	57,8	1,17	8,35
10	0,60	0,38	1,0	2,8	5,5	8,8	15,1	21,1	27,1	33,1	38,0	43,0	50,5	56,7	62,5	69,8	70,8	65,2	1,32	12,26
<b>Průměr</b>	1,41	5,18	10,56	16,36	21,69	26,67	33,06	38,22	42,50	46,56	49,49	52,35	56,24	59,56	62,26	65,49	66,67	66,51	<b>0,74</b>	<b>19,80</b>
<b>Medián</b>	0,7	1,2	4,2	9,1	14,3	20,0	28,0	34,3	40,1	45,2	48,9	52,4	57,9	63,3	67,6	72,7	73,8	71,1	0,68	15,09
<b>SD</b>	2,4	7,4	12,3	16,3	19,1	21,2	22,8	23,5	23,7	23,8	23,2	22,9	22,0	21,1	20,3	19,3	19,0	18,9	0,52	13,32
<b>RSD %</b>	173,2	143,5	116,8	99,7	88,2	79,5	69,0	61,6	55,7	51,1	46,9	43,8	39,1	35,5	32,6	29,4	28,5	28,4	<b>70,14</b>	<b>67,28</b>

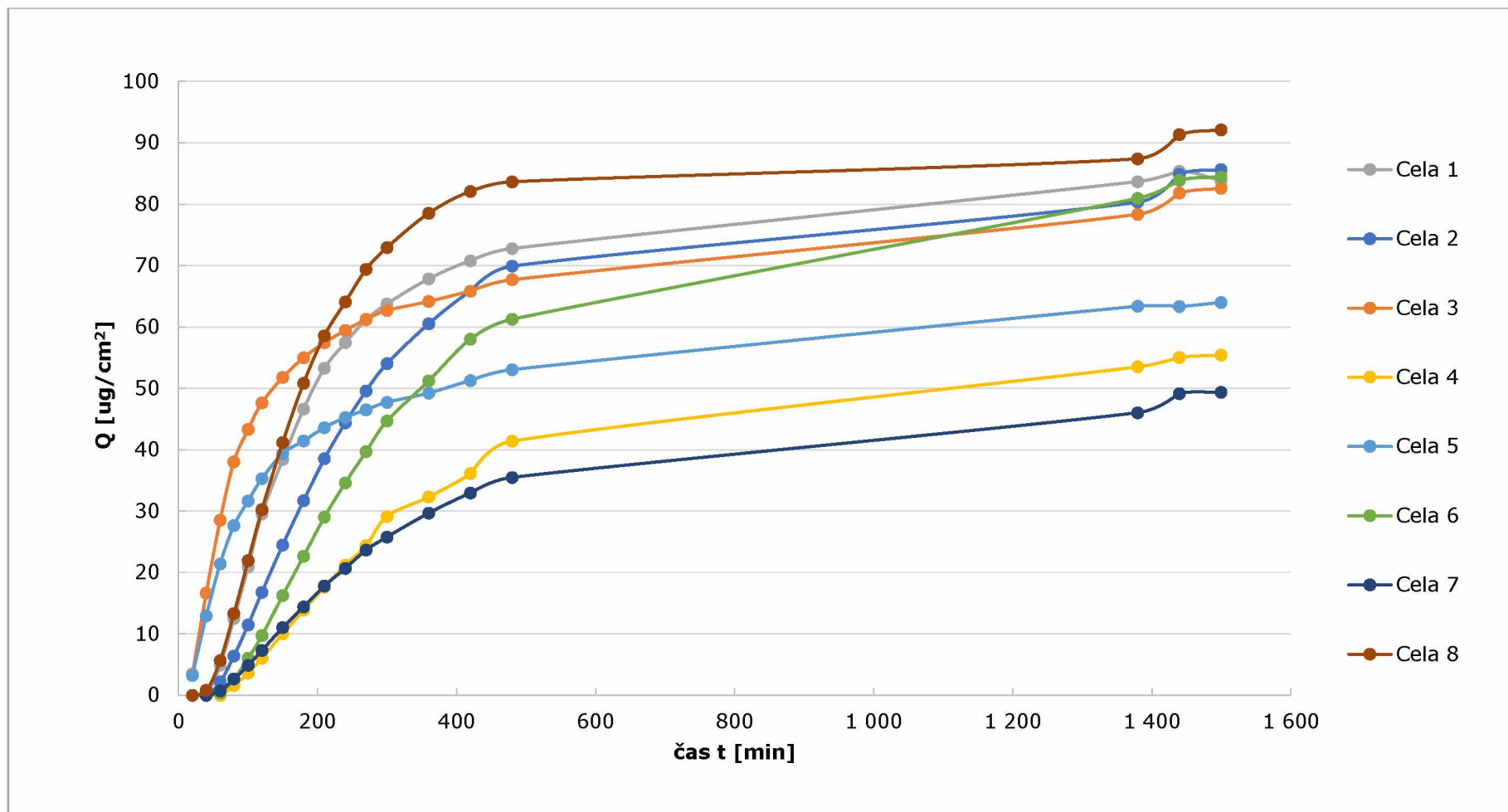
*Příloha F – Testování 3: Graf popisující průběh penetrace (Komerční prasečí kůže 1)*



*Příloha G – Testování 4: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Komerční prasečí kůže 2)*

Cela č.	Kumulativní množství Q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]																		Lag time	Flux
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
čas [h]	0,33	0,67	1,00	1,33	1,67	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	6,00	7,00	8,00	23,00	24,00	25,00		
čas [min]	20	40	60	80	100	120	150	180	210	240	270	300	360	420	480	1 380	1 440	1 500	[h]	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]
1	0,0	0,1	4,9	12	20,9	29,5	38,4	46,6	53,3	57,4	61,2	63,7	67,8	70,8	72,8	83,7	85,4	83,8	0,76	22,15
2	0,00	0,0	2,2	6,4	11,5	16,8	24,5	31,7	38,5	44,4	49,6	54,0	60,5	65,8	69,9	80,3	84,9	85,6	0,96	15,41
3	3,45	16,66	28,5	38,0	43,3	47,6	51,8	55,0	57,4	59,4	61,2	62,7	64,1	65,9	67,7	78,3	81,8	82,6	0,10	30,92
4	0,00	0,0	0,0	1,6	3,6	6,0	10,0	13,9	17,6	21,2	24,4	29,1	32,3	36,1	41,4	53,5	55,0	55,4	1,32	7,99
5	3,21	12,9	21,4	27,6	31,6	35,3	39,3	41,4	43,6	45,2	46,5	47,7	49,2	51,3	53,0	63,4	63,3	64,0	0,05	22,25
6	0,00	0,0	0,4	2,6	6,0	9,7	16,3	22,6	29,0	34,6	39,7	44,7	51,2	58,0	61,2	81,0	83,9	84,4	1,31	13,08
7	0,00	0,0	0,7	2,6	4,9	7,3	11,0	14,4	17,8	20,7	23,7	25,8	29,7	32,9	35,5	46,0	49,1	49,4	1,04	7,21
8	0,00	0,8	5,7	13,3	21,9	30,2	41,2	50,8	58,6	64,1	69,4	72,9	78,5	82,1	83,6	87,4	91,3	92,1	0,77	23,73
<b>Průměr</b>	0,83	3,8	8,0	13,1	18,0	22,8	29,1	34,6	39,5	43,4	46,9	50,1	54,2	57,9	60,6	71,7	74,3	74,7	<b>0,79</b>	<b>17,85</b>
<b>Medián</b>	0,00	0,06	3,6	9,4	16,2	23,1	31,4	36,6	41,1	44,8	48,1	50,9	55,9	61,9	64,5	79,3	82,8	83,2	0,87	18,78
<b>SD</b>	1,54	6,85	10,86	13,25	14,23	15,12	15,71	16,30	16,71	16,78	16,99	16,68	17,04	16,99	16,36	15,37	16,02	16,00	0,49	8,31
<b>RSD %</b>	185,33	179,8	136,2	101,3	79,20	66,30	54,08	47,17	42,32	38,69	36,20	33,30	31,45	29,36	26,97	21,43	21,55	21,43	<b>61,81</b>	<b>46,54</b>

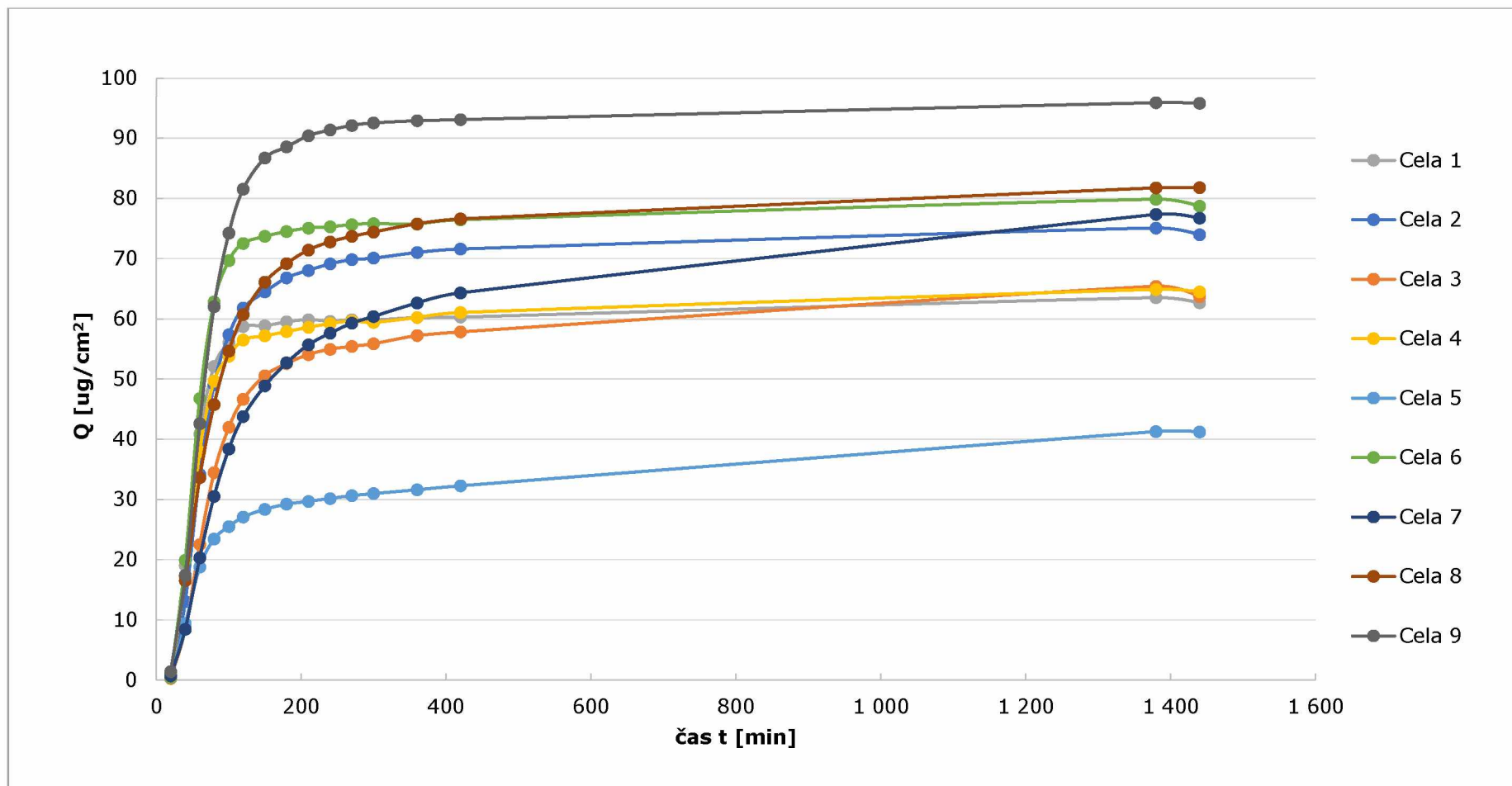
*Příloha H – Testování 4: Graf popisující průběh penetrace (Komerční prasečí kůže 2)*



*Příloha CH – Testování 5: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Lidská kůže)*

Cela č.	Kumulativní množství Q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]																Lag time	Flux
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
čas [h]	0,33	0,67	1,00	1,33	1,67	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	6,00	7,00	23,00	24,00	[h]	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]
čas [min]	20	40	60	80	100	120	150	180	210	240	270	300	360	420	1 380	1 440		
1	0,5	19,0	40,9	52	56,1	58,7	58,9	59,5	59,9	59,6	59,8	59,8	60,2	60,3	63,5	62,6	0,40	71,44
2	0,52	13,1	34,2	49,1	57,3	61,8	64,5	66,8	68,0	69,1	69,8	70,1	71,0	71,6	75,1	74,0	0,39	54,24
3	0,29	8,55	22,5	34,4	42,0	46,6	50,6	52,6	54,1	54,9	55,4	55,9	57,2	57,8	65,4	63,7	0,35	34,06
4	0,68	17,0	38,0	49,7	53,8	56,5	57,2	57,9	58,6	59,2	59,6	59,4	60,2	61,0	64,9	64,5	0,38	61,90
5	0,49	9,4	18,8	23,4	25,5	27,1	28,4	29,2	29,7	30,2	30,6	31,0	31,6	32,3	41,3	41,2	0,00	24,82
6	0,43	19,9	46,8	62,8	69,6	72,5	73,7	74,5	75,1	75,3	75,6	75,8	75,7	76,4	79,8	78,7	0,42	82,76
7	0,73	8,5	20,3	30,5	38,4	43,8	48,9	52,7	55,7	57,6	59,3	60,4	62,6	64,3	77,3	76,7	0,05	23,02
8	1,45	16,6	33,6	45,8	54,6	60,7	66,1	69,2	71,4	72,8	73,7	74,4	75,8	76,6	81,7	81,8	0,24	42,44
9	1,45	17,4	42,6	62,0	74,2	81,5	86,7	88,5	90,4	91,3	92,1	92,5	92,9	93,1	95,9	95,8	0,46	80,31
<b>Průměr</b>	0,78	15,11	34,38	46,91	53,69	57,81	60,52	62,28	63,59	64,38	65,07	65,42	66,24	66,94	72,43	71,91	<b>0,29</b>	<b>55,12</b>
<b>Medián</b>	0,60	16,79	36,06	49,36	55,35	59,68	61,66	63,14	63,95	64,35	64,83	65,23	66,80	67,94	76,19	75,33	0,39	58,07
<b>SD</b>	0,43	4,32	10,12	13,84	15,69	16,67	17,27	17,40	17,65	17,74	17,79	17,82	17,72	17,63	16,17	16,13	0,18	23,36
<b>RSD %</b>	54,8	28,6	29,4	29,5	29,2	28,8	28,5	27,9	27,8	27,6	27,3	27,2	26,7	26,3	22,3	22,4	<b>60,82</b>	<b>42,39</b>

*Příloha I – Testování 5: Graf popisující průběh penetrace (Lidská kůže)*

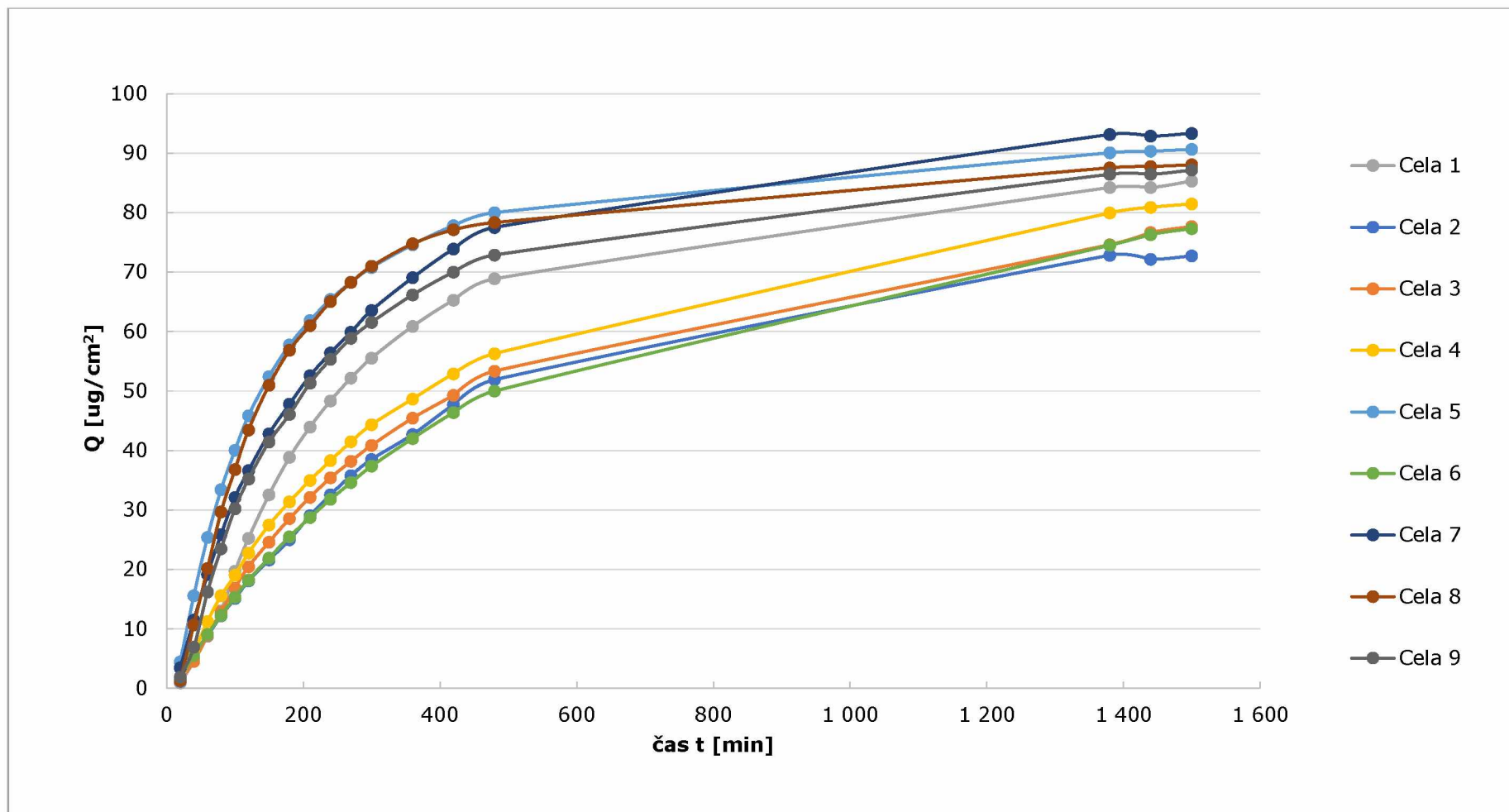


*Příloha J – Testování 6: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Strat-M membrána)*

Cela č.	Kumulativní množství Q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]																		Lag time	Flux
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
čas [h]	0,33	0,67	1,00	1,33	1,67	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	6,00	7,00	8,00	23,00	24,00	25,00	[h]	[ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]
čas [min]	20	40	60	80	100	120	150	180	210	240	270	300	360	420	480	1 380	1 440	1 500		
1	0,9	4,5	8,8	13	19,7	25,3	32,5	38,8	43,9	48,4	52,2	55,5	60,9	65,3	68,9	84,2	84,2	85,3	0,53	18,45
2	1,15	5,0	8,8	12,2	15,1	18,0	21,6	25,0	29,0	32,6	35,8	38,5	42,7	47,7	51,9	72,8	72,1	72,7	0,81	13,99
3	1,32	4,58	8,9	12,9	16,9	20,4	24,6	28,5	32,1	35,4	38,2	40,8	45,4	49,3	53,4	74,6	76,6	77,7	0,00	42,93
4	1,41	6,1	11,3	15,6	19,0	22,7	27,5	31,4	35,0	38,3	41,5	44,3	48,7	52,9	56,3	80,0	80,9	81,5	1,17	7,28
5	4,42	15,6	25,4	33,4	40,0	45,8	52,4	57,7	61,8	65,4	68,3	70,8	74,6	77,8	80,0	90,1	90,3	90,6	0,00	33,29
6	1,72	5,5	9,1	12,3	15,3	18,2	21,9	25,5	28,7	31,8	34,6	37,4	42,0	46,4	50,0	74,5	76,3	77,3	1,08	11,36
7	3,43	11,5	19,1	25,9	32,1	36,6	42,8	47,8	52,6	56,4	59,9	63,6	69,1	73,9	77,5	93,2	92,9	93,3	0,81	6,30
8	1,32	10,7	20,2	29,6	36,8	43,4	51,0	56,9	61,0	65,0	68,3	71,0	74,8	77,1	78,3	87,5	87,8	88,1	0,69	22,22
9	1,86	6,9	16,2	23,4	30,2	35,2	41,4	46,1	51,3	55,3	58,8	61,5	66,2	70,0	72,9	86,5	86,5	87,2	0,01	15,87
<b>Průměr</b>	1,96	7,93	13,9	19,4	24,4	28,8	34,3	38,9	43,0	46,7	49,8	52,7	57,3	61,3	64,5	82,1	82,6	83,3	<b>0,64</b>	<b>17,30</b>
<b>Medián</b>	1,36	5,81	10,17	14,30	19,37	23,99	30,00	35,10	39,46	43,33	46,83	49,94	54,77	59,10	62,59	82,09	82,56	83,39	0,75	14,93
<b>SD</b>	1,18	3,85	6,19	8,24	9,57	10,68	11,93	12,72	13,01	13,25	13,34	13,39	13,31	12,85	12,15	7,28	6,91	6,74	0,44	11,66
<b>RSD %</b>	60,52	48,58	44,41	42,61	39,28	37,06	34,78	32,66	30,23	28,39	26,77	25,39	23,25	20,96	18,83	8,87	8,36	8,10	<b>68,86</b>	<b>67,41</b>



Příloha K – Testování 6: Graf popisující průběh penetrace (Strat-M membrána)



*Příloha L – Testování 7: Tabulka s hodnotami z průběhu penetrace (Prasečí kůže z domácího prasete)*

Cela č.	Kumulativní množství Q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]																		Lag time	Flux
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
čas [h]	0,33	0,67	1,00	1,33	1,67	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	4,50	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00	23,00	24,00	[h]	$[\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}]$
čas [min]	20	40	60	80	100	120	150	180	210	240	270	300	360	420	480	540	1 380	1 440		
1	0,0	0,3	0,8	4	9,4	15,1	22,2	27,8	32,0	35,3	37,7	39,6	42,2	44,1	46,0	47,2	54,8	55,7	0,75	11,44
2	0,0	0,4	0,9	4,5	12,3	21,5	33,3	42,6	49,1	53,6	56,8	59,1	61,8	63,8	64,7	65,4	69,6	69,8	1,10	22,58
3	0,0	0,38	0,5	1,1	2,9	5,6	10,0	14,4	18,2	21,8	24,7	27,2	31,4	34,3	36,8	38,8	48,1	49,7	1,04	6,89
4	0,0	0,4	0,6	1,9	4,7	7,9	12,2	16,2	19,1	21,7	23,6	25,3	27,7	29,8	31,6	33,4	50,0	52,7	0,33	5,29
5	0,0	0,3	0,4	1,1	3,1	6,2	11,6	16,7	21,1	25,0	28,3	30,9	35,0	39,3	43,0	45,2	55,4	57,1	1,05	7,91
6	0,0	0,4	0,5	1,6	4,3	8,1	14,2	20,4	25,9	31,3	35,8	39,6	45,3	49,9	53,5	56,6	70,8	72,6	1,05	9,93
7	0,0	0,4	0,8	2,5	5,3	8,9	14,4	19,6	24,4	29,1	32,7	36,3	40,8	44,1	46,3	47,9	56,1	57,4	1,01	9,50
8	0,0	0,4	1,0	3,8	8,1	12,5	18,5	24,3	29,2	33,2	36,6	39,4	43,9	47,5	50,5	53,5	72,7	75,2	0,48	8,79
9	0,0	0,4	0,5	2,4	8,4	16,9	30,2	41,5	50,6	57,5	62,5	66,8	72,0	75,4	77,4	79,1	83,1	83,5	1,33	18,63
10	0,3	0,36	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8	0,00	0,00
<b>Průměr</b>	0,00	0,37	0,66	2,53	6,49	11,41	18,53	24,84	29,96	34,28	37,63	40,46	44,47	47,56	49,99	51,90	62,30	63,75	<b>0,90</b>	<b>11,22</b>
<b>Medián</b>	0,00	0,37	0,56	2,44	5,33	8,91	14,39	20,44	25,94	31,31	35,81	39,39	42,23	44,09	46,26	47,85	56,14	57,35	1,04	9,50
<b>SD</b>	0,00	0,02	0,22	1,26	3,21	5,45	8,42	10,60	12,15	13,00	13,55	13,94	14,21	14,27	14,01	13,89	12,04	11,77	0,32	5,69
<b>RSD %</b>	0,0	5,0	33,2	49,7	49,5	47,7	45,4	42,7	40,5	37,9	36,0	34,4	32,0	30,0	28,0	26,8	19,3	18,5	<b>35,53</b>	<b>50,77</b>

*Příloha M – Testování 7: Graf popisující průběh penetrace (Prasečí kůže z domácího prasete)*

