

# DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská Fakulta

Doktorský studijní program: Lékařská biofyzika

## **Využití luminiscenční a spektrofotometrické metody ke stanovení sensibilizace *in vitro***

Mgr. Svobodová Lada

Školitelka: Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji disertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

Praha, 2022

.....  
Mgr. Svobodová Lada

## Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za příležitost spolupracovat s katedrou Lékařské biofyziky, za ochotu a cenné rady během mého studia.

Dále děkuji RNDr. Kristině Kejlové, Ph.D. a MUDr. Dagmar Jírové, CSc. za odborné vedení mé disertační práce, veškerou pomoc během mého studia a vytvoření výborných pracovních podmínek. Děkuji také celému kolektivu Oddělení alternativních toxikologických metod Státního zdravotního ústavu v Praze za spolupráci na publikacích, poskytnuté informace, materiál a příjemné podmínky a pomoc při práci.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky – RVO („Státní zdravotní ústav, IČ: 75010330“), projektu ERDS/ESF - "Mezinárodní konkurenceschopnost SZÚ ve výzkumu, vývoji a vzdělávání v alternativních toxikologických metodách" (č. VZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000860), grantu MŠMT - "TraiN-SafeMDs: Síť vzdělávacích pracovišť pro zlepšení vědomostí o bezpečnosti zdravotnických prostředků se zaměřením na ústní dutinu" (8X20026), grantu Ministerstva průmyslu a obchodu České republiky FV-TRIO - "Funkcionalizace ochranných oděvů aplikací finálních úprav prádelenskými postupy a prodloužení životnosti oděvů reaktivací efektů v rámci prádelenského servisu a náhradou bavlny směsnými konstrukcemi" (FV40146).

## Abstrakt

V současnosti se pro identifikaci rizika sensibilizace kůže používá tzv. definovaný přístup (DA, Defined Approach), který zahrnuje kombinaci metod pokrývajících alespoň dvě ze tří klíčových událostí ("2 ze 3") vedoucích ke kožní sensibilizaci. Dle OECD jsou to klíčové události (KE, key event): kovalentní vazba na protein KE1 (např. DPRA, OECD TG 442C), aktivace keratinocytů KE2 (např. LuSens, OECD TG 442D) a aktivace dendrických buněk KE3 (např. h-CLAT, OECD TG 442E).

Hlavním cílem práce bylo zavedení metody OECD TG 442D (LuSens), jako jedné ze tří *in vitro* metod k hodnocení potenciálu kožní sensibilizace látek a směsí bez použití testů na zvířatech. Byla hodnocena bezpečnost zdravotnických prostředků, spotřebních výrobků, kosmetických prostředků, ingrediencí, přísad a konzervantů i finálních úprav ochranných oděvů. Metoda LuSens je citlivější k některým typům materiálů, jako je např. latex, guma, silikon, či rostlinným extraktům a esenciálním olejům, které jsou často součástí zdravotnických prostředků.

Experimentální práce byla mimo samotné zavedení metody též zaměřena na řešení problematiky přípravy extraktů zdravotnických prostředků a spotřebních výrobků. Studie s využitím buněčné linie lidských keratinocytů (LuSens) odhalila, že může být mnohem užitečnější pro predikci hazardu kožní sensibilizace u člověka než konvenční zkouška *in vivo* s využitím lokálních lymfatických uzlin myši (LLNA). Kombinovaná přesnost, což je průměr citlivosti a specifčnosti metody vzhledem k referenčním datům na lidech, je u metody LLNA 58 %, v případě alternativních metod ("2 ze 3") se jedná o 88 %. Uvedená metoda ve vhodné kombinaci s dalšími alternativními metodami tak nejen může zcela nahradit testy na zvířatech, ale poskytuje výsledky, které jsou přesnější a mají větší relevanci k lidským datům, než data získaná testy na zvířatech.

**Klíčová slova:** kožní sensibilizace, buněčná linie LuSens, extrakty zdravotnických prostředků, spotřební výrobky, kosmetika, kosmetické přísady, ingredience a konzervanty, bezpečnost ochranných oděvů

## **Abstract**

Currently, the so-called Defined Approach (DA) is used to identify the risk of skin sensitisation, which includes a combination of methods covering at least two of the three key events ("2 out of 3") leading to skin sensitisation. According to OECD, the key events (KE) comprise: covalent binding to protein KE1 (e.g. DPRA, OECD TG 442C), activation of keratinocytes KE2 (e.g. LuSens, OECD TG 442D) and activation of dendritic cells KE3 (e.g. h-CLAT, OECD TG 442E).

The main aim of the work was to implement the OECD TG 442D (LuSens) assay as one of the three *in vitro* methods designed to assess the potential for skin sensitisation of substances and mixtures without using animal tests. The safety of medical devices, consumer products, cosmetics, ingredients, additives and preservatives as well as final protective clothing treatments was evaluated. The LuSens method is more sensitive to certain types of materials, such as latex, rubber, silicone, or plant extracts and essential oils, which are often part of medical devices.

In addition to the LuSens assay implementation, the experimental work was also focused on addressing the issue of the preparation of extracts of medical devices and consumer products. A study using the human cell line of keratinocytes (LuSens) revealed that it may be much more useful for predicting skin sensitisation in humans than the conventional *in vivo* method using murine local lymph nodes (LLNA). The combined accuracy, which is the average of the sensitivity and specificity of the method relative to the reference data on humans, is 58 % for the LLNA and 88 % for the alternative methods ("2 out of 3"). Thus, the LuSens method, in appropriate combination with other alternative methods, not only can completely replace animal tests, but also the results obtained are more accurate and relevant to human data than those obtained by animal tests.

**Key words:** skin sensitization, LuSens cell line, medical device extracts, consumer products, cosmetics, cosmetic ingredients, ingredients and preservatives, safety of protective clothing

## Cíle práce

Cílem této práce bylo zavést do laboratorní praxe pro Oddělení alternativních toxikologických metod Státního zdravotního ústavu metodu k hodnocení kožní sensibilizace *in vitro*: LuSens (OECD TG 442D), s využitím luminiscenční a spektrofotometrické metody pro studium účinků chemických látek a spotřebních výrobků. Jedná se o alternativní toxikologickou metodu *in vitro* bez použití zvířat využívající imortalizovanou buněčnou linii lidských keratinocytů modifikovaných vnesením genu umožňujícím sledovat kožní sensibilizaci. Tato zkouška byla zavedena a optimalizována pro stanovení rizika kožní sensibilizace u společensky závažných látek s možným zdravotním rizikem.

- V rámci grantového projektu ERDS/ESF "Mezinárodní konkurenceschopnost SZÚ ve výzkumu, vývoji a vzdělávání v alternativních toxikologických metodách" (č. VZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000860) byly z hlediska bezpečnosti kožní sensibilizace ověřeny předměty běžného užívání včetně kosmetických prostředků a jejich ingrediencí, zdravotnických prostředků, chemických látek a osobních ochranných pomůcek.
- V rámci grantového projektu "TraiN-SafeMDs: Síť vzdělávacích pracovišť pro zlepšení vědomostí o bezpečnosti zdravotnických prostředků se zaměřením na ústní dutinu" (8X20026), zaměřeného na zlepšení znalostí o bezpečnosti zdravotnických prostředků, byly nově vyvíjené zdravotnické prostředky podrobeny baterii toxikologických zkoušek. Pro hodnocení biokompatibility byla provedena dílčí zkouška kožní sensibilizace *in vitro*.
- S použitím alternativní metody *in vitro* byl hodnocen potenciál kožní sensibilizace u skupiny komerčně dostupných erotických pomůcek, které mohou být použity i jako zdravotnické prostředky (např. Venušiny kuličky) pro posílení svalů pánevního dna u žen po porodu či v boji s inkontinencí. V rámci grantového projektu "Funkcionalizace ochranných oděvů aplikací finálních úprav prádelenskými postupy a prodloužení životnosti oděvů reaktivací efektů v rámci prádelenského servisu a náhradou bavlny směsnými konstrukcemi" (FV40146), byly provedeny zkoušky k ověření antimikrobiálního efektu, toxikologických vlastností a zdravotní bezpečnosti. Jedním z dílčích testů pro ověření bezpečnosti ochranných oděvů po styku s kůží a možného vzniku sensibilizace byla metoda LuSens.

## Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Cíle práce.....	6
Seznam zkratk.....	9
Úvod.....	12
2 Teoretická část.....	15
2.1 Kůže.....	15
2.2 Sensibilizace kůže.....	16
2.3 Dráha škodlivého účinku (AOP).....	20
2.4 Testovací metody vyvinuté na základě klíčových událostí AOP.....	22
2.4.1 Metody hodnotící první klíčovou událost dráhy škodlivého účinku (KE1) ..	22
2.4.2 Metody hodnotící druhou klíčovou událost dráhy škodlivého účinku (KE2)	22
2.4.3 Metody hodnotící třetí klíčovou událost dráhy škodlivého účinku (KE3) ....	23
3 Experimentální část.....	26
3.1 Metodika.....	26
3.1.1 Buněčná linie.....	26
3.1.2 Rozmražení buněčné linie, pasážování a propagace.....	27
3.1.3 Příprava buněčné suspenze, nasazení buněk a inkubace.....	28
3.1.4 Expozice testovanou látkou.....	28
3.1.5 Měření luminiscence a absorpance.....	30
3.1.6 Vyhodnocení.....	32
3.1.7 Kontrola validity testu.....	32
3.1.8 Použité analytické metody.....	32
4 Výsledky a diskuze.....	35
4.1 Kosmetika, kosmetické přísady, ingredience a konzervanty.....	35
4.1.1 Parfémy.....	35
4.1.2 Diskuze.....	37
4.1.3 UV filtry.....	38
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone.....	39
4.1.4 Diskuze.....	42
4.1.5 Koloranty – Ftalocyaniny.....	43
4.1.6 Diskuze.....	46
4.1.7 Koloranty – Azobarviva.....	46

4.1.8	Diskuze .....	50
4.1.9	Parabeny.....	52
4.1.10	Diskuze .....	56
4.2	Zdravotnické prostředky .....	58
4.2.1	Diskuze .....	62
4.3	Předměty běžného užívání – spotřební výrobky .....	63
4.3.1	Erotické pomůcky .....	63
4.3.2	Diskuze .....	65
4.4	Funkcionalizace ochranných oděvů aplikací finálních úprav prádelenskými postupy.....	67
4.4.1	Diskuze .....	70
5	Závěr.....	72
6	Seznam literatury .....	74
7	Publikační činnost autora .....	93
7.1	Práce související s disertační prací.....	93
7.2	Ostatní publikace.....	95
	Příloha č. 1 .....	98
	Příloha č. 2 .....	100
	Příloha č. 3 .....	102



## Seznam zkratek

AA	Arachidonic acid
ACD	Allergic Contact Dermatitis
ADRA	Amino Acid Derivative Reactivity Assay
AOP	Adverse Outcome Pathway
ARE	Antioxidant response element
BBP	Benzyl butyl phthalate
DA	Defined Approach
DBP	Dibutyl phthalate
DC	Dendritic cell
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalate
DIBP	Diisobutyl phthalate
DINP	Diisononyl phthalate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNOP	Di-n-octyl phthalate
DPRA	Direct Peptide Reactivity Assay
EC	European Commission
ECHA	European Chemical Agency
ECVAM	European Center for Validation of Alternative Methods
EGDMA	Ethylene glycol dimethacrylate
EU	European Union
FC	Food colorants
FBS	Fetal bovine serum
GPMT	Guinea Pig Maximisation Test

h-CLAT	Human Cell Line Activation test
HICC	4-(4-hydroxy-4-methylpentyl)-3-cyclohexene-1 carboxaldehyde
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
IL-8 Luc assay	Interleukin-8 Reporter Gene Assay
kDPRA	kinetic Direct Peptide Reactivity Assay
KE1,2,3,4	Key event 1,2,3,4
Keap1	Kelch like ECH-associated protein 1
LA	Lactic acid
LLNA	Local Lymph Node Assay
MHC	Major histocompatibility complex
MTT	Methyltetrazolium bromide
NC	Negative control
NLM	National Library of Medicine
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OD	Optical density (570 nm)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Positive control
PHBA	Kyselina p-hydroxybenzoová
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pur	Puromycin
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RT	Room temperature

SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TLR	Toll-like receptors
U-SENS™	U937 Cell Line Activation Test
US EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultraviolet
VC	Vehicle control
5-LO	5-lipoxygenase

## Úvod

Člověk je po celou dobu svého života nepřetržitě vystaven vlivu mnoha faktorů, které mohou vyvolávat akutní či chronickou toxicitu, mutagenitu, karcinogenitu, teratogenitu či sensibilizaci. Porozumění těmto faktorům (fyzikálním, chemickým, biologickým) působícím na lidský organismus je historicky spojeno s použitím pokusných zvířat jako experimentálního modelu při vývoji vědy a medicíny. V rámci průmyslové revoluce došlo k výraznému rozvoji chemického průmyslu, farmacie, ale i toxikologie. Bylo vyvinuto velké množství nových chemických látek s neznámými účinky pro lidský organismus, které bylo nutno ověřit s ohledem na jejich bezpečnost před uvedením na trh (Bauch *et al.*, 2012). S rozvojem pokusů na zvířatech je však také spojena společenská a etická iniciativa tyto pokusy omezit či zcela zastavit. V roce 1959 se poprvé objevil pojem alternativní metody k pokusům na zvířatech a s nimi související principy 3R. Na základě principů 3R (*Reduction* – snížení počtu zvířat, *Refinement* – zmírnění postupů, omezení bolesti a strachu, a *Replacement* – nahrazení jiným testem bez použití zvířat) vznikla snaha o minimalizování použití pokusných zvířat ve výzkumu. Tyto principy se staly základním kamenem pro vědecký vývoj a vedly k zavedení postupů *in vitro* (Russell, 1995).

Ve druhé polovině osmdesátých let se začal rozvíjet teoretický a praktický rámec toxikologie *in vitro* jako samostatné disciplíny. Dřívější přístup byl jiný, poznatky směřovaly od tkání k buňkám. Na počátku 20. století byl zahájen výzkum opačným směrem, s cílem dosáhnout co nejvíce poznání o jediné buňce, objasnit a identifikovat mechanismy bazální toxicity. V tomto období se pozornost soustředila především na struktury vyskytující se uvnitř buněk, které se dostávají do kontaktu s toxickými látkami. Avšak mechanismy „proč“ a „jak“ nebyly stále ještě objasněny. V následujících letech se pak zájem soustředil na mechanismy toxického působení, a to i díky výraznému zlepšení metodik v práci s tkáňovými kulturami (Zucco *et al.*, 2004).

V posledních letech je jedním z hlavních přístupů metod *in vitro* nastolení podmínek a interakcí mezi buňkami tak, aby byly co nejlépe simulovány podmínky *in vivo*. Dále také došlo k dosti přesné identifikaci koncových bodů *in vitro* přístupů, které se zabývají otázkou specifických toxických účinků na cílové orgány (Myers *et al.*, 2017).

Jednou z mnoha výhod *in vitro* metod je možnost kultivovat buňky získané přímo z lidských tkání, což může pomoci získat komplexnější a spolehlivější údaje pro hodnocení

toxikologických rizik pro člověka (Myers *et al.*, 2017). Testování toxicity chemických látek na tkáňových kulturách je výhodné z etického hlediska díky ušetření velkého počtu experimentálních zvířat a navíc jsou alternativní metody z praktického hlediska mnohem rychlejší, ekonomičtější a efektivnější. Alternativní metody využívající lidských buněčných kultur jsou z vědeckého hlediska průkaznější vzhledem ke studiu působení chemických látek v lidských buňkách v porovnání s jinými často používanými druhy, jako jsou potkan nebo myš, kde výsledek působení chemické látky může být zcela odlišný díky rozdílům ve fyziologii či metabolismu (Myers *et al.*, 2017).

Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2003/65/ES týkající se ochrany zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely je zaměřena na snížení počtu zvířat použitých při pokusech v rámci testování chemických látek, léčiv a potravin. Ve směrnici je přímo uvedeno, že: „Pokus nesmí být proveden, pokud je dostupná jiná vědecky platná metoda bez použití zvířete, která může být použita za účelem získání požadovaného výsledku“ (ES, 2003).

V roce 1991 bylo založeno Evropské centrum pro validaci alternativních metod (ECVAM), které má na starosti vývoj, validaci a prosazení vědeckého a legislativního přijetí alternativních metod v Evropské unii. V roce 2004 byl zaveden úplný zákaz testování finálních kosmetických výrobků na zvířatech, což v následujících letech vyústilo v úplný zákaz uvádění na trh kosmetických ingrediencí a prostředků testovaných na zvířatech (EC, 2003). Evropská unie také zavedla systém REACH (*Registration* – registrace, *Evaluation* – hodnocení, *Authorization* – povolení a *Restriction* – omezení chemických látek), v jehož rámci měla být otestována toxicita až 30 000 chemických látek vyráběných v množství přesahujícím jednu tunu ročně. Cílem nařízení REACH bylo zajištění ochrany lidského zdraví a životního prostředí a také subvence vývoje alternativních metod pro hodnocení rizik chemických látek (EC, 2006). Pokud by k tomuto ověření byly použity klasické testy na zvířatech, použitý počet experimentálních zvířat by se pohyboval mezi 4 – 12 miliony a testy by trvaly desítky let. Z tohoto důvodu vznikla nutnost vypracovat v rámci mezinárodní spolupráce strategickou baterii vhodných alternativních metod pro testování průmyslových chemických látek (Kolmanová, 2012).

Jedním ze základních aspektů, který je třeba vždy brát v úvahu při vývoji metod založených na biologických systémech, je relevance získaných údajů pro humánní praxi, tj.

predikce účinků pro lidskou populaci (Purchase, 1986). Druhým problémem jsou potíže s dostupností *in vivo* dat, která korelují s výsledky *in vitro*. Třetím aspektem je variabilita biologických systémů, která může ovlivnit nejen relevanci testu, ale také jeho spolehlivost (standardizaci). Čtvrtou klíčovou roli hraje převod nového experimentálního modelu na zkušební postup. Nové testy *in vitro* byly přijaty do mezinárodních předpisů a mnohé další byly přijaty vědeckým výborem ECVAM. Postup validace je však průběžně revidován, a tedy upřesňován podle získaných zkušeností, zohledněného specifického cíle a také vnitřní povahy zkoušky.

Na základě současných vědeckých poznatků o chemických a biologických mechanismech souvisejících s kožní sensibilizací byla vytvořena koncepce dráhy škodlivého účinku AOP – Adverse Outcome Pathway spolu s odpovídajícími alternativními metodami (MacKay, 2013; OECD, 2014), která sleduje události vedoucí k nepříznivému zdravotnímu účinku, tj. alergické kontaktní dermatitidě lidí nebo kontaktní přecitlivělosti hlodavců (Adler et al., 2011; OECD, 2012).

## 2 Teoretická část

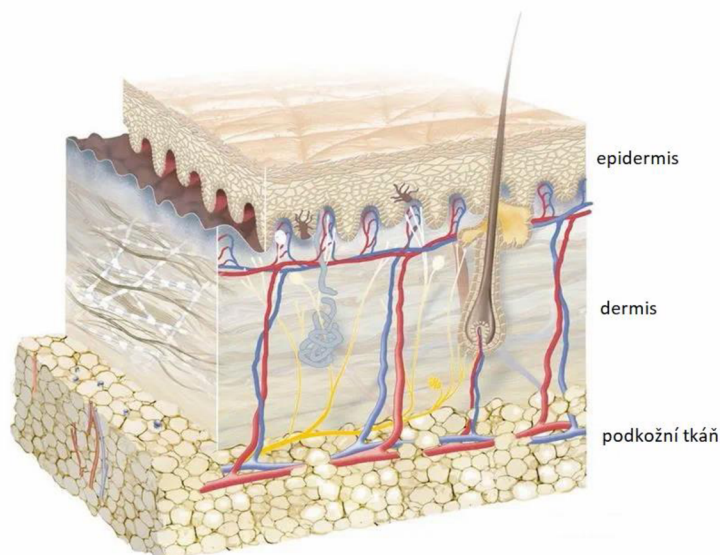
### 2.1 Kůže

Kůže je největší orgán lidského těla o ploše 1,8 m<sup>2</sup>, který tvoří první obrannou linii proti infekcím a patogenům přicházejícím zvnějšku (Rehfeld *et al.*, 2017). Její role je klíčová pro regulaci teploty, produkci vitaminů a její smyslové schopnosti nám napomáhají v interakci s prostředím.

Kůže je měnící se dynamický orgán, který se skládá ze tří vrstev (obr. 1). Vrchní vrstva epidermis je tenká vrstva o tloušťce přibližně 0,1 mm stratifikovaného dlaždicového epitelu, složená ze čtyř až pěti vrstev keratinocytů v postupných fázích diferenciaci. Stratifikovaný epitel vytváří vodotěsnou bariéru z vnějšího prostředí a zabraňuje nadměrné ztrátě vody z těla. Epidermis se skládá především z keratinocytů, nacházejí se zde však i melanocyty, které prostřednictvím exprese melaninu zajišťují bariéru před ultrafialovým (UV) zářením. Epidermis nemá vlastní krevní zásobení, ale je vyživována z cév v nižších vrstvách pod sebou.

Druhou vrstvu tvoří dermis, silná, pružná, pevná vrstva o síle 3-4 mm, která má relativně nízký objem buněk ve srovnání s epidermis. Dermis je tvořena kolagenními a elastinovými vlákny, která zajišťují sílu a pružnost. Kromě celulární matrice obsahuje dermis struktury jako jsou krevní vlasečnice, které vyživují epidermis a zároveň odstraňují škodlivé látky, pojivová vlákna - fibroblasty a mastocyty, které se podílejí na hojení ran, a mazové a potní žlázy vytvářející hydrofilní vrstvu. Dále se zde nacházejí lymfatické cévy, smyslové receptory a vlasové kořínky.

Nejhlubší vrstva kůže, podkožní tkáň, slouží k uchování energie a zároveň působí jako tlumič nárazů a izolace těla. Tato vrstva je tvořena kolagenními vlákny, tukovými buňkami a krevními cévami (Chambers & Vukmanovic-Stejic, 2020).



Obr. 1: Stavba kůže (převzato z <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>)

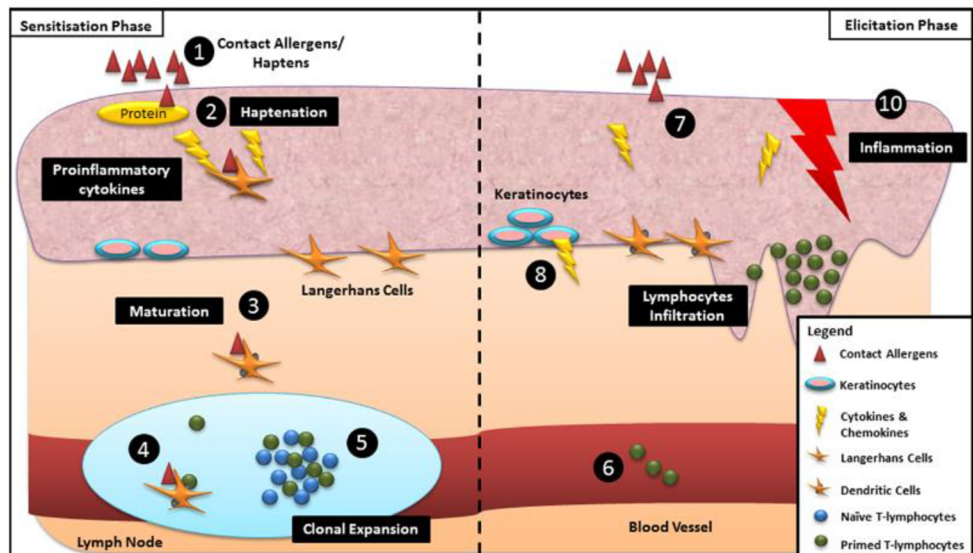
## 2.2 Sensibilizace kůže

Chemické látky způsobující alergickou reakci po styku s kůží se nazývají kožní sensibilizátory. Od 19. století došlo k výraznému nárůstu výskytu alergických onemocnění. Jednou z nejpravděpodobnějších příčin je vystavení našich organismů stále většímu množství chemických látek, než tomu bylo v minulosti. Vystavení chemickým látkám může způsobit kožní alergii již od velmi útlého věku. Odhaduje se, že každý rok v EU přibude 180 000 nových případů sensibilizace (ECHA, 2020), v posledních letech je to častěji u mladších dětí než u dospělých (Thyssen *et al.*, 2007).

Sensibilizace kůže je jedním ze sledovaných parametrů toxicity. Jakmile je člověk citlivý na alergen, musí se mu po zbytek života vyhýbat, aby zabránil vzniku alergické reakce (ECHA, 2020). Existují čtyři typy kožní přecitlivělosti založené na imunologickém mechanismu, který zprostředkovává onemocnění, konkrétně typ I (okamžitý/související s IgE), u kterého reakce kožního testu dosáhne vrcholu za 2 hodiny; typ II (cytotoxicita související s protilátkou a komplementem); typ III (zprostředkovaný komplexem antigen-protilátka); a reakce typu IV nebo opožděné hypersenzitivity, která se může objevit během 48–72 hodin (Lee a Thomson, 1999; Posadas a Pichler, 2007). Alergická kontaktní dermatitida (ACD) je typ IV opožděné hypersenzitivní reakce nebo alergie (Ouyang *et al.*, 2014).



Alergická kontaktní dermatitida má dvě fáze: indukci a elicitaci (Kimber *et al.*, 2002a). Ve fázi indukce chemická látka nebo alergen proniká přes zevní část epidermis. Během tohoto průchodu jsou chemické látky potenciálně vystaveny biotransformačním procesům, které mohou zvýšit nebo snížit alergenní potenciál. Výchozí chemická látka nebo metabolit pak tvoří stabilní konjugát s nosnými proteiny uvnitř kůže (Enoch *et al.*, 2011). Tento stabilní konjugát nebo haptén-proteinový komplex je poté zpracován epidermálními dendritickými buňkami (tj. Langerhansovými buňkami) a dermálními dendritickými buňkami, které následně dozrávají a migrují z epidermis do místních lymfatických uzlin. Komplexy haptén-proteinů mohou také reagovat a aktivovat reakci v keratinocytech, které pak mohou interagovat s dendritickými buňkami. V lymfatických uzlinách dendritické buňky představují hlavní molekuly histokompatibilního komplexu, které zahrnují část haptén-proteinového komplexu až po naivní T-lymfocyty (Huppert *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2020). To vyvolává diferenciaci a proliferaci alergenních T-buněk specifické paměti, z nichž některé znovu cirkulují po celém těle (Obr. 2). Elicitační fáze nastává po následném kontaktu se stejným alergenem. Opět dochází k tvorbě haptén-proteinového konjugátu, který je následně absorbován epidermálními dendritickými buňkami, stejně jako dalšími buňkami prezentujícími antigen (Clausen a Stoitzner, 2015). Cirkulující alergenově specifické, aktivované paměťové T-buňky vyvolají sekreci specifických cytokinů, které indukují uvolňování zánětlivých cytokinů a mobilizaci cytotoxických T-buněk, jakož i dalších zánětlivých buněk v krvi. Tyto buňky migrují do epidermis a vyvolávají charakteristickou lokální zánětlivou reakci (Obr. 2). ACD může podstatně ovlivnit kvalitu života pacientů s nepříjemnými příznaky kožní vyrážky, puchýřů nebo otoků (Obr. 3, 4), které mohou v některých případech přetrvávat po celý život (Strickland *et al.*, 2016).



Obr. 2. Přehled mechanismů během sensibilizační a elicitace fáze kožní sensibilizace (převzato z <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00094>)

**Legenda:** 1. Hapteny prostupují zdravou kůží 2. Dochází k vazbě haptenu na kožní proteiny 3. Langerhansovy buňky se váží na haptenu-proteinový komplex a diferencují se na vyzrálé dendritické buňky během migrace do lymfatické uzliny 4. Langerhansovy buňky prezentují haptenu-proteinový komplex naivním T-lymfocytům 5. Klonální expanze specifických efektorů a paměťových T-buněk 6. Proliferované T-lymfocyty se šíří do krevního oběhu, což způsobuje sensibilizaci jedince 7. Opětovné vystavení jedince podobným haptenu 8. Uvolnění zánětlivých cytokinů a chemokinů epidermálními buňkami 9. Infiltrace T-buněk z krevních cév do místa kontaktu 10. Rozvoj alergické kontaktní dermatitidy.



Obr. 3: ACD na ruce (převzato z <https://www.molnlycke.us/biogel-gloves/contact-dermatitis/>)



Obr. 4: ACD na obličejí (převzato z <https://www.medicalnewstoday.com/articles/322484>)

Latence mezi expozicí látky a výskytem vyrážky se s následnými expozicemi zkracuje. Sensibilizace kůže je běžný, ale velmi závažný pracovní a ekologický zdravotní problém. ACD je nejčastějším projevem imunotoxicity u lidí (Aeby *et al.*, 2010; Basketter a Kimber, 2009; Adler *et al.*, 2011; Kimber *et al.*, 2011).

Dalším aspektem aktivace DC a rozvoje sensibilizace kůže, který může být relevantní pro buněčné testovací systémy, je požadavek na signály nebezpečí. Pojem signál nebezpečí byl vytvořen k popisu druhého signálu, který je nutný pro úplné rozvinutí adaptivní imunitní odpovědi (Matzinger, 1998). Ve skutečnosti musí být setkání s cizím antigenem doprovázeno určitou úrovní zánětu, lokálním traumatem nebo poškozením buněk. Účelem je zabránit spuštění zbytečné a nepřiměřené imunitní reakce, pokud neexistuje žádná hrozba, která by byla signalizována lokálním poškozením nebo traumatem, u kterého se očekává, že bude spojen s vpádem antigenu. Znamky poškození jsou rozpoznávány prostřednictvím receptorů pro rozpoznávání patogenů (Kimber *et al.*, 2011). Z nich jsou nejdůležitější charakterizovány Toll-like receptory (TLR). Signály nebezpečí se také uplatňují při vyvolání imunitní odpovědi na chemické alergeny při sensibilizaci kůže (McFadden and Basketter, 2000; Kimber *et al.*, 2002b). V současné době existují důkazy, že ligace TLR může hrát důležitou roli ve vývoji sensibilizace kůže. Z nedávného výzkumu vyplynulo, že TLR4 má důležitou funkci při vzniku alergie na nikl (Schmidt *et al.*, 2010). Nikl je velmi častou příčinou ACD v Severní Americe, ale i v Evropě. V minulosti se ukázalo, že je velmi obtížné a často až nemožné stimulovat sensibilizaci solí niklu u myši. V testu lokálních lymfatických uzlin (LLNA) na myších je nikl (správně) považován za falešně negativní. Nyní byl

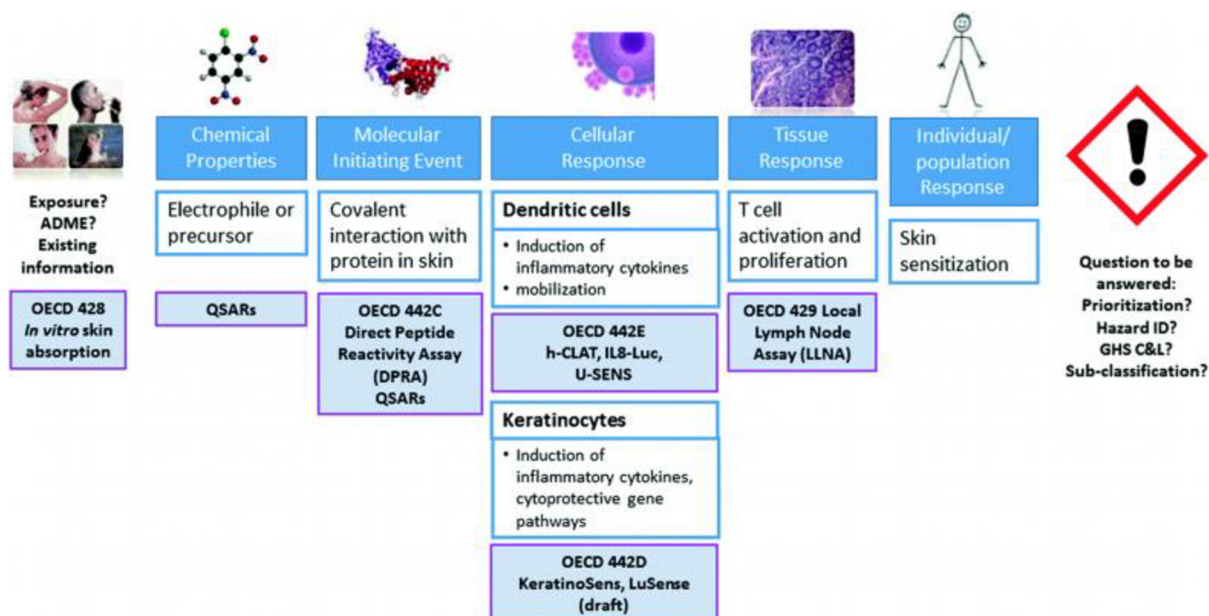
vysvětlen imunobiologický základ pro tento druhový rozdíl, kdy se ukázalo, že ionty niklu mohou přímo spustit aktivaci lidského TLR4. Tato aktivace je závislá na přítomnosti nechráněných histidinů na receptoru v pozicích 456 a 458. Tyto zbytky se nacházejí na lidském TLR4, ale ne na ekvivalentním receptoru u myši (Schmidt *et al.*, 2010). Význam tohoto objevu spočívá v tom, že u lidí na rozdíl od myši mohou ionty Ni<sup>2+</sup> indukovat sensibilizaci kůže, protože prostřednictvím aktivace TLR4 je možné vyvolat zánětlivé signály, které jsou nezbytné k zahájení a udržení adaptivní imunitní odpovědi.

### **2.3 Dráha škodlivého účinku (AOP)**

Dráha škodlivého účinku (AOP) je sled událostí od chemické struktury cílové chemikálie nebo skupiny podobných chemikálií, přes molekulární iniciační událost až po klinický projev *in vivo*. Každá AOP představuje stávající znalosti týkající se vazby mezi molekulární iniciační událostí, sledem dílčích kroků a nepříznivým výsledkem na úrovni jednotlivce nebo populace.

Znalosti AOP pro sensibilizaci kůže vyvolané kovalentní vazbou látek na proteiny se za posledních deset let značně vyvinuly a lze je shrnout do jedenácti kroků, které zahrnují čtyři události považované za klíčové (key events, KE).

První klíčovou událostí je molekulární interakce s kožními proteiny v místě působení. Konkrétně se cílová chemická látka nebo metabolický produkt či abiotický transformační produkt cílové chemické látky kovalentně váže na cysteinové nebo lysinové zbytky (KE1). Druhá klíčová událost se odehrává v keratinocytech (KE2) a zahrnuje zánětlivé reakce a genovou expresi spojenou s konkrétní signální cestou buněk (v závislosti na odezvě antioxidantního elektrofilního elementu). Třetí klíčovou událostí je aktivace dendritických buněk (KE3), která je hodnocena na základě exprese specifických markerů buněčného povrchu, chemokinů a cytokinů. Poslední klíčovou událostí je proliferace T-buněk (KE4), což nakonec vede k alergické kontaktní dermatitidě (Jowsey *et al.*, 2006; OECD, 2010; OECD, 2014).



Obr. 5. Sensibilizace kůže – dráha AOP, ověřené metody pro hodnocení KE (převzato z [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-2447-5\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-2447-5_11))

Nejběžněji používaný test na zvířatech je test s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA) založený na komplexní sérii událostí, které jsou základem imunitní odpovědi po expozici chemickému sensibilizátoru, zahrnující všechny klíčové události (Williams *et al.*, 2015). Tento test je široce přijímaný a nabízí výhody oproti tradičním testům na morčatech (GPMT nebo Buehlerův test), ve smyslu snížení počtu zvířat (*reduction*) a zmírnění utrpení změnou protokolu (*refinement*) při používání zvířat (Basketter *et al.*, 2007). Vytvoření dráhy AOP pro sensibilizaci kůže však umožnilo vývoj mnoha testovacích metod bez použití zvířat, které jsou spojeny s jednou nebo více klíčovými událostmi AOP (Mehling *et al.*, 2012; Reisinger *et al.*, 2015). AOP zahrnuje chemické interakce probíhající na molekulární úrovni a nikoli na úrovni celého zvířete. Nepříznivé účinky pozorované *in vivo* jsou tedy výsledkem mnoha biologických odpovědí a chemické struktury toxické látky. Tyto metody byly navrženy tak, aby se zaměřily na jednotlivé klíčové události (OECD, 2014). V současné době jsou k dispozici zkoušky bez použití zvířat, postihující tři klíčové události AOP (OECD TG 442 C, D a E), zahrnující celkem osm metod. Podle současného názoru by tyto metody neměly být považovány za samostatné testy, ale spíše v kontextu víceúrovňové testovací strategie, tzv. Definovaného přístupu (DA), který přistupuje ke klasifikaci na základě údajů z několika alternativních metod. Složitost základní biologie dále naznačuje, že k předpovědi účinnosti sensibilizátoru není dostatečné pouze použití jedné metody *in vitro* (Rovida *et al.*,

2015; Urbisch *et al.*, 2015). Z tohoto důvodu se předpokládá, že pouze kombinace několika metod v integrované strategii testování zabrání potřebě testování na zvířatech (MacKay *et al.*, 2013).

V současnosti existuje celá řada národních a mezinárodních regulačních požadavků na zkoušky k identifikaci kožních sensibilizátorů. Evropské, ale i americké regulační orgány mají odlišné požadavky na údaje o sensibilizaci kůže v závislosti na kategorii použití látky, ale téměř všechny tradičně spoléhaly na testy využívající zvířecích modelů (Daniel *et al.*, 2018). Až v roce 2009 Evropská unie stanovila úplný zákaz testování všech složek kosmetiky na zvířatech, což podnítilo rychlý vývoj a používání alternativních metod (EC, 2003). Také nařízení REACH, které bylo přijato s cílem zlepšit ochranu lidského zdraví a životního prostředí v souvislosti s riziky, které mohou představovat chemické látky, podporuje alternativní metody k hodnocení rizik látek za účelem snížení počtu zkoušek na zvířatech. Zatímco REACH obecně vyžaduje, aby testy na zvířatech byly používány jako poslední možnost, nařízení z roku 2017 vyžaduje použití metod *in vitro* a *in silico* jako první volbu pro sensibilizaci kůže a umožňuje testování na zvířatech jen za výjimečných okolností (EU, 2016; Sauer *et al.*, 2016).

## **2.4 Testovací metody vyvinuté na základě klíčových událostí AOP**

### **2.4.1 Metody hodnotící první klíčovou událost dráhy škodlivého účinky (KE1)**

*In chemico* metody byly navrženy ke zkoumání molekulárně iniciační události AOP pro sensibilizaci kůže, konkrétně reaktivity proteinů, pomocí kvantifikace reaktivity zkoušených látek vůči modelovým syntetickým peptidům (lysinu a cysteinu). Hodnocení úbytku lysinových a cysteinových zbytků je využito k diskriminaci mezi sensibilizátory a nesensibilizátory kůže. (OECD TG 442C; Gerberick *et al.*, 2004; OECD, 2019).

- Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)
- Amino Acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)
- The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA)

### **2.4.2 Metody hodnotící druhou klíčovou událost dráhy škodlivého účinky (KE2)**

Jedná se o *in vitro* metody s využitím adherentních buněčných linií odvozených z lidských keratinocytů obsahujících gen pro luciferázu, pod transkripční kontrolou konstitutivního promotoru k aktivaci signální dráhy Nrf2/Keap1/ARE. Antioxidační responzivní element je up-regulován kontaktními sensibilizátory, což umožňuje

kvantitativní měření indukce luciferázového genu (luminiscenční detekcí) za použití známých substrátů produkujících světlo, jako ukazatele aktivity transkripčního faktoru v buňkách po expozici elektrofilním látkám (OECD TG 442D; Natsch, 2010; Natsch *et al.* 2011; OECD, 2018a).

- KeratinoSens<sup>TM</sup>
- LuSens

### **2.4.3 Metody hodnotící třetí klíčovou událost dráhy škodlivého účinku (KE3)**

Navržené *in vitro* metody kvantifikují změny v expresi markerů buněčného povrchu spojených s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk (tj. CD86 a CD54) v buněčné linii THP-1 lidské monocytární leukémie po expozici sensibilizujícím látkám. Naměřené hodnoty exprese buněčných markerů CD86 a CD54 se poté používají k diskriminaci mezi sensibilizátory a nesensibilizátory (OECD TG 442E; Sakaguchi *et al.*, 2009; OECD, 2018b).

- Human Cell Line Activation test (h-CLAT)

Metoda U-SENS<sup>TM</sup> kvantifikuje změnu v expresi markeru buněčného povrchu spojeného s procesem aktivace monocytů a dendritických buněk (tj. CD86) v buněčné linii lidského histiocytárního lymfomu U937 po expozici sensibilizátorům (Piroird *et al.*, 2015). Naměřené hladiny exprese CD86 markeru buněčného povrchu v buněčné linii U937 se pak použijí pro podporu rozlišení mezi kožními sensibilizátory a nesensibilizátory (OECD TG 442E; OECD, 2018b).

- U937 cell line activation Test (U-SENS<sup>TM</sup>)

Na rozdíl od testů analyzujících expresi markerů buněčného povrchu, test IL8-Luc kvantifikuje změny v expresi IL-8, cytokinu spojeného s aktivací dendritických buněk (DC). V odvozené THP-1 reportérové buněčné linii (THP-G8, vytvořené z lidské akutní monocytární leukemické buněčné linie THP-1) se exprese IL-8 měří po expozici sensibilizátorům (Takahashi *et al.*, 2011). Exprese luciferázy se pak využívá k rozlišení mezi sensibilizátory kůže a látkami, které nesensibilizují (OECD TG 442E; OECD, 2018b).

- Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

Každý z těchto validovaných testů postihuje pouze jednu klíčovou událost, zatímco sensibilizace kůže je komplexní imunitní odpověď. Z tohoto důvodu se pouze jedna alternativní metoda, která hodnotí pouze jednu klíčovou událost, považuje za nedostatečnou pro hodnocení schopnosti testované látky vyvolat sensibilizaci kůže. Stále více je kladen důraz na komplexní hodnocení, které kombinuje nejméně dvě metody *in chemico* nebo *in vitro*, což vede k přístupu „2 ze 3“ (OECD, 2017a; Bauch *et al.*, 2012). Provedou se dva testy postihující jednu ze tří klíčových událostí (KE1-3). Pokud se výsledky obou testů shodují, je rozhodování jednoznačné. V případě, že jsou výsledky testů v rozporu, měl by být proveden třetí test, postihující jinou klíčovou událost. Všechny současné testy jednoduše reflektují různé způsoby hodnocení reaktivity chemických sloučenin a vykazují přitom specifická technická omezení. Relevance predikce na základě jejich kombinovaného použití závisí na tom, jak různé testy vzájemně kompenzují své nevýhody. V práci Roberts a Patlewicz (2018) bylo naznačeno, že nejsou nutné více než dvě metody (konkrétně DPRA a h-CLAT), které mohou poskytnout podstatně vyšší úroveň účinnosti než přístup „2 ze 3“. Strategie postupného testování kombinující 1 až 3 modely k pokrytí hlavních klíčových událostí sensibilizace kůže AOP by mohla být použita pro přístup zdola nahoru, který by minimalizoval nebezpečí falešně negativního výsledku (Scott *et al.*, 2010). Studie publikovaná Otsubo *et al.* (2017) uvádí, že binární testovací baterie KeratinoSens a h-CLAT by mohla být užitečná jako součást přístupu zdola nahoru, kde testovací strategie navrhuje použití zkušebních metod, které mohou spolehlivě definovat látky nesensibilizující. Bylo vyvinuto mezinárodní úsilí o nalezení definovaného přístupu, který by se skládal ze zavedeného postupu interpretace dat aplikovaného na výsledky, generovaného pomocí definovaného souboru informačních zdrojů s cílem odvodit predikci sensibilizace kůže (OECD, 2017b; Coleman *et al.*, 2015).

V současnosti slouží LLNA jako referenční metoda, se kterou se porovnávají nové alternativní přístupy. LLNA postihuje čtvrtou klíčovou událost dráhy škodlivého účinku a může prokázat platnost nových metod (Basketter *et al.*, 2009). Přesnost *in vitro* metod, v rámci DA, dosahuje hodnot mezi 76-85 % v porovnání s LLNA, která dosahuje přesnosti pouze 74 % (Kleinstreuer *et al.*, 2018). Cílem je snaha o nahrazení *in vivo* testů pomocí kombinace několika alternativních metod (Adler *et al.*, 2011). Na rozdíl od systému zkoušek *in vivo*, které jsou intaktními dynamickými systémy, jsou alternativní přístupy metod *in chemico* a *in vitro* relativně statické a zaměřují se na charakterizaci nebo kvantifikaci



jednotlivých chemických, biochemických nebo buněčných dějů pro následné použití v DA hodnocení dráhy AOP.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Metodika

LuSens je *in vitro* metoda identifikující kožní sensibilizátory pomocí geneticky modifikované linie lidských keratinocytů po 48hodinové expozici buněčné linie testovaným chemickým látkám/ extraktům. Kvantitativně jsou detekovány změny v aktivitě luciferázového substrátu vůči negativní kontrole (NC), s potvrzením validity pomocí pozitivní kontroly (PC), kontroly reagensí (VC) a kontroly pozadí (Blank).

#### 3.1.1 Buněčná linie

Imortalizované lidské keratinocyty jsou modifikovány vnesením genu umožňujícím sledovat kožní sensibilizaci (gen ARE z *Rattus norvegicus*) kódující gen pro NADPH: quinone oxidoreduktázu 1. Vzhledem k vysoké homologii responzivního elementu ARE je tato sekvence funkční u lidí a je up-regulována kontaktními sensibilizátory. To umožňuje kvantitativní detekci indukce luciferázového genu po aktivaci reportérového transkripčního faktoru Nrf2 v buňkách po expozici potenciálně sensibilizujícím látkám.

Antioxidační responzivní element ARE je vnesen do buněk transfekcí pomocí plazmidového vektoru pGL4.20 [Luc2/Puro] nesoucím gen pro luciferázu (reportér) a gen pro rezistenci vůči Puromycinu (selektor). Dále vektor obsahuje syntetický reportérový gen Luc2 z *Photinus pyralis*, kódující enzym luciferázu, katalyzující ATP dependentní oxidativní dekarboxylaci substrát (přeměna luciferinu za produkce světelné emise 562 nm) a gen Amp z *E.coli* kódující enzym penicilin beta-laktamázu, zajišťující rezistenci buněčné linie vůči penicilinovým antibiotikům (prevence bakteriální kontaminace) (Emter et al., 2010).



Obr. 6. Buněčná linie LuSens (fotografie autora)

Buněčná linie LuSens (P4, klon 16) byla poskytnuta firmou BASF SE (Německo) v rámci vědecké spolupráce se SZÚ. Buněčná linie byla rozkultivována, část linie byla uložena v tekutém dusíku a část v  $-80^{\circ}\text{C}$  v laboratořích SZÚ. Buňky byly před použitím v testu ověřeny laboratoří Centra epidemiologie a mikrobiologie, Národní referenční laboratoře pro chřipku a nechrípková respirační virová onemocnění, SZÚ, metodou PCR a nebyla prokázána přítomnost DNA *Mycoplasma species*. Pro experimenty byla použita buněčná suspenze s pasáží 4 až 16.

### 3.1.2 Rozmražení buněčné linie, pasážování a propagace

Pracovní kultura uložená v  $-80^{\circ}\text{C}$  se rozmrazí tak, že se kryovialka nechá 5 minut při laboratorní teplotě, poté se buňky resuspendují v 7 ml média 1 (bez puromycinu), centrifugují se 5 min při 380x g. Poté se odsaje zamrazovací médium, buňky se resuspendují v 7 ml média 1 (s puromycinem) a převedou se do kultivační lahve T25. Buňky se inkubují 24 hod., poté se médium 1 odsaje a buňky se opláchnou PBS (bez iontů) a přidá se médium 1 (s puromycinem). Práce probíhá za sterilních podmínek, propagace se provádí 2 x týdně v T25 tkáňových lahvích se 7 ml média 1, minimálně 3 pasáže po rozmrazení, dále pak v T75 tkáňových lahvích s 20 ml média 1 při  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ .

## Přehled všech používaných médií v metodě LuSens

Média	Složky
médium 1	D-MEM + 10 % FBS + P/S + (Pur)
médium 2	D-MEM + 10 % FBS
médium 3	D-MEM + 1 % FBS
zamrazovací médium	médium1 + 10 % DMSO

### 3.1.3 Příprava buněčné suspenze, nasazení buněk a inkubace

Kultura z pasáže 4 - 16 o konfluenci 80-90 % se opláchne 10 ml PBS (s 0,05 % EDTA) a sklídí se do média 2. Do každé T75 lahve se přidá 2 ml trypsinu a lahev se inkubuje cca 5-7 min. při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Po uvolnění z povrchu lahve se buňky spláchnou z povrchu proudem 3 ml média a resuspendují se na konečný objem 5 ml. Ze získané buněčné suspenze se stanoví počet buněk a připraví se buněčná suspenze na hustotu 88 000 buněk/deska v médiu 2. Objem 120 µl buněčné suspenze se pipetuje do všech jamek kromě H12 transparentní TPP destičky a bílé destičky s průhledným dnem. Desky se inkubují po dobu 24 hod při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.1.4 Expozice testovanou látkou

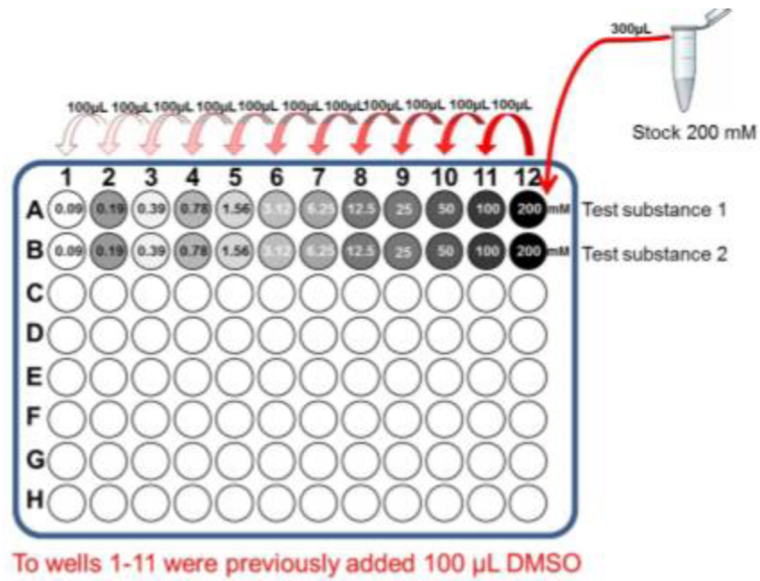
Testovaná látka byla rozpuštěna v DMSO (100x zásobní roztok). Konečná koncentrace DMSO s buňkami nesmí přesáhnout 1 % z důvodu cytotoxicity, proto bylo dle metodiky připraveno ředění následovně:

- 1) 100x ředící deska (zásobní roztok testovaných látek, nejvyšší přípustná koncentrace 200 mM pro metodu LuSens).

Postup pro testování 2 látek ve 12 koncentracích:

- Do jamek AB1-AB11 se pipetovalo 100 µl DMSO
- Do jamky A12 se pipetovalo 200 µl zásobního roztoku testované látky I. o koncentraci 200 mM
- Do jamky B12 se pipetovalo 200 µl zásobního roztoku testované látky II. o koncentraci 200 mM

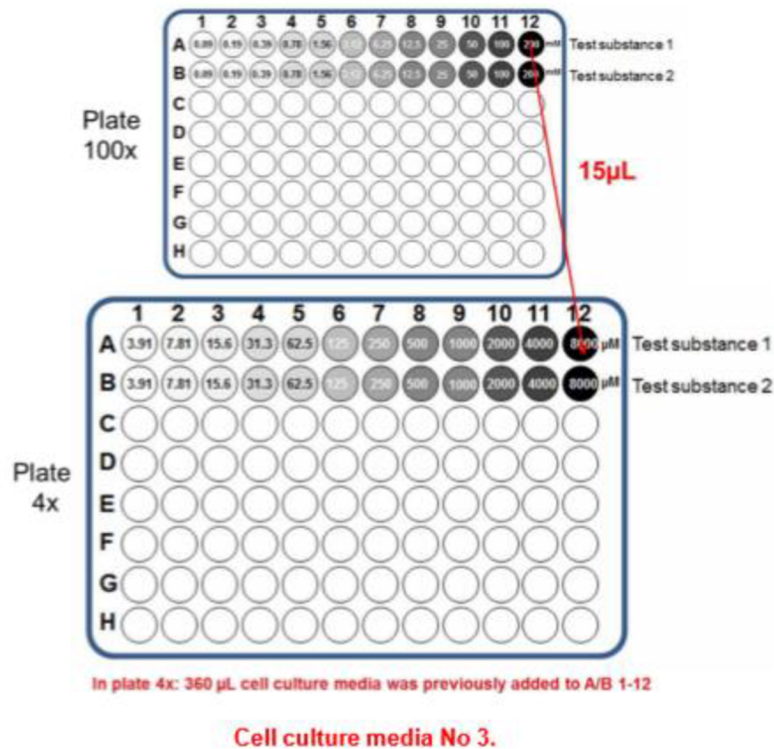
Objem 100 µl se přenesl ze sloupce 12 do sloupce 11, postupně až do sloupce 1. Před i po přenesení se objem míchal 3x (viz schéma níže).



2) Dále se připravila 4x ředící deska (ze 100x ředící desky)

Postup:

- Do jamek AB1-AB12 se pipetovalo 360 µl média 3
- Ze 100x DMSO desky, jamek AB1-12 se přenášelo 15 µl do ekvivalentních jamek 4x ředící desky (viz schéma níže)



K buňkám se aplikovalo 50 µl testované látky ze 4x ředící desky do každé jamky, která obsahovala 150 µl D-MEM (konečný objem: 200 µl/jamka). Buňky byly inkubovány po dobu 48 hodin. Látky byla aplikovány ve dvanácti nebo šesti koncentracích v triplicátu.

Schéma: deska se 2 testovanými látkami ve 12 koncentracích

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1
B	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1
C	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L1
D	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2
E	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2
F	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2	L2
G	VC	VC	VC	VC	VC	VC	VC	VC	VC	VC	VC	VC
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	B

Extrakt byly připraveny v D-MEM nebo v DMSO podle povahy materiálu, nebo v obou vehikulech. Extrakt byly aplikovány v šesti koncentracích v triplicátu pro D-MEM (100%-75%-50%-25%-10%-1%) a pro DMSO (100%-50%-25%-12,5%-6,25%-3,125%), současně konečná koncentrace DMSO s buňkami byla 100x ředěnější, z důvodu cytotoxicity DMSO nad 1 %. Buňky byly inkubovány po dobu 48 hodin.

Schéma: deska se 4 testovanými extrakty v 6 koncentracích

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L2	L2	L2	L2	L2	L2
B	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L2	L2	L2	L2	L2	L2
C	L1	L1	L1	L1	L1	L1	L2	L2	L2	L2	L2	L2
D	L3	L3	L3	L3	L3	L3	L4	L4	L4	L4	L4	L4
E	L3	L3	L3	L3	L3	L3	L4	L4	L4	L4	L4	L4
F	L3	L3	L3	L3	L3	L3	L4	L4	L4	L4	L4	L4
G	VC	VC	VC	VC	VC	VC	M	M	M	M	M	M
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	PC	PC	PC	PC	PC	B

V rámci každého experimentu byla zařazena pozitivní kontrola (EGDMA, koncentrace 120 µM), negativní kontrola (DL-kyselina mléčná, 5000 µM) a odpovídající rozpouštědlová kontrola.

### 3.1.5 Měření luminiscence a absorbance

Po uplynutí 48hodinové expoziční doby byly bílé desky pro měření luminiscence dvakrát omyty 360 µl PBS (s Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>). Poté byl připraven roztok luciferázy (jeden díl PBS bez Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> a jeden díl činidla One-Glo®). Luminiscence byla měřena na luminometru GloMax multireader (Promega).

Luciferázový systém One-Glo® pracovní roztok:

Látka/roztok	Množství	Příprava, skladovací podmínky
Steady-Glo/ One-Glo zásobní roztok	10 ml	Roztok Steady-Glo přímo z chladničky a PBS temperované na laboratorní teplotu se míchají <u>v temnu</u> v poměru 1:1.  Množství: 200 µl / jamku.
PBS bez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	10 ml	

Z průhledných desek bylo odsáto D-MEM s látkou a bylo přidáno čerstvé D-MEM s barvicím roztokem MTT, deska se nechala v inkubátoru barvit po dobu 2 hodin. Životaschopnost buněk byla stanovena na spektrofotometru Eon (Biotek) při vlnové délce 570 nm.

Vitální barvivo MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) je za normálních podmínek žluté barvy. Mitochondriální enzymy dýchacího řetězce, umístěné na membránách živých buněk, redukuje MTT na fialový formazan, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Po solubilizaci buněk lyzačním roztokem se nerozpustný formazan z buněk uvolní, a vznikne tak čirý roztok vhodný k fotometrickému stanovení. Hodnota absorbance určuje množství živých buněk.

MTT zásobní roztok:

Látka/roztok	Množství	Příprava, skladovací podmínky
MTT	5 mg/ml	Nechat rozpustit v termostatu, ve tmě (obalené alobalem). Filtrovat (sterilní filtr 0,45 µm).
PBS (bez Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )		

MTT pracovní roztok:

Látka/roztok	Množství	Příprava
MTT zásobní roztok, filtrovaný	1 díl (2 ml/ 1 deska)	
D-MEM + 1% FBS	9 dílů (18 ml/ 1 deska)	20 ml /1 deska 200 µl /1 jamka

Lyzační roztok:

Látka/roztok	Množství
SDS	10 g
DMSO	99,6 ml
Kyselina octová 100%	0,4 ml

### 3.1.6 Vyhodnocení

Indukce luminiscence (I) byla vypočtena vydělením relativní luminiscenční jednotky (RLU) exponovaných buněk (T) ku RLU buněk s kontrolou rozpouštědla (VC) s použitím následující rovnice:

$$I = \text{RLU (T)} - \text{RLU (Blank)} / \text{RLU (VC)} - \text{RLU (Blank)}$$

Zkoušená látka byla považována za látku se sensibilizačním potenciálem, pokud indukce luciferázové aktivity byla vyšší nebo rovna 1,5násobku v porovnání s kontrolou rozpouštědla a zároveň životaschopnost buněk (V) byla vyšší nebo rovna 70 % alespoň ve 3 testovaných koncentracích.

$$V (\%) = (\text{OD (T)} - \text{OD (Blank)}) / (\text{OD (VC)} - \text{OD (Blank)}) * 100$$

### 3.1.7 Kontrola validity testu

Pro validitu experimentu musí pozitivní kontrola (PC) vykazovat indukci luciferázové aktivity  $\geq 2,5$  a současně životnost buněk musí být minimálně 70 %, negativní kontrola (NC) musí dosahovat indukce luciferázové aktivity  $< 1,5$ . Variační koeficient rozpouštědlové kontroly (VC) musí být do 20 % a alespoň 3 testované koncentrace musí mít relativní životnost nad 70 %. Výsledek je posuzován jako validní, pokud 2 nezávislá opakování vykazují shodu, v případě rozdílných výsledků je třeba provést třetí nezávislý experiment. Na základě 3. nezávislého experimentu se poté vyhodnotí látka jako sensibilizující/nesensibilizující.

### 3.1.8 Použité analytické metody

#### 3.1.8.1 Spektrofometrie

Měření absorpce světla po průchodu vzorkem patří mezi nejpoužívanější techniky v lékařské chemii a biochemii. Elektromagnetické záření je pohlcováno mnoha látkami, avšak míra, jakou látka pohlcuje světlo různých vlnových délek, závisí na struktuře sloučeniny. Látky absorbují záření o určitých vlnových délkách s energií fotonů



odpovídajících rozdílů energií elektronových hladin. U řady látek obsahujících valenční elektron může být tento elektron excitován elektromagnetickým zářením do vyšší energetické hladiny. Lidskému oku se pak látka jeví jako barevná, pokud absorbované záření leží ve viditelné části spektra. Absorbance je veličina udávající, kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem, a je přímo úměrná koncentraci absorbující látky. Pro měření absorbance se používají techniky založené na principu pohlcení monochromatického světla různých vlnových délek látkou. Jedná se o fotometry (měření probíhá při jedné nebo několika přesně definovaných vlnových délkách) a spektrofotometry (měření probíhá v souvislém úseku vlnových délek nebo lze vlnová délka libovolně nastavit).

Rutinně se dnes používají fotometry se svislým paprskem, které disponují výhodou měření v mikrotitračních destičkách, kde se vzorky měří v polystyrenových destičkách s 96 jamkami (používají se také další formáty od 4 do 384 jamek). Oproti klasickému uspořádání není vyžadováno velké množství vzorku, pracné zpracování jednotlivých vzorků a vyměňování kyvet, což je náročné po stránce časové i finanční. U klasických fotometrů se absorbance měří vodorovným paprskem a optická dráha je dána tloušťkou kyvety. Fotometrie se svislým paprskem využívá k měření absorbance délku optické dráhy, která je závislá na výšce hladiny v jamce. Pokud se ke vzorku přidá určité množství bezbarvého roztoku (např. isopropanol), dojde ke snížení koncentrace absorbující látky, ale zároveň se úměrně zvýší hladina roztoku v jamce, prodlouží se optická dráha, a výsledná absorbance bude tudíž stejná. Na rozdíl od klasické fotometrie, kdy absorbance odpovídá koncentraci látky v roztoku, závisí absorbance při měření svislým paprskem na látkovém množství absorbující látky ve vzorku. Mikrotitrační destičky jsou jednorázové a s ohledem na počet měřených vzorků v rámci jedné destičky mnohem levnější než plastové kyvety. Změřit jednu desku s 96 jamkami netrvá déle než několik vteřin. Výhodou je i menší objem vzorku, jamky se obvykle plní objemem 100 – 300  $\mu\text{l}$ . U destičkových fotometrů se jako monochromátor používají sady interferenčních filtrů. Pro větší přehlednost se kromě pojmu absorbance používá termín optická hustota (OD – *optical density*). Optická hustota závisí na vlastnostech vzorku, nikoli na délce optické dráhy, po níž světlo vzorkem prochází.

### **3.1.8.2 Luminometrie**

Pojem luminiscence je odvozen z latinského slova lumen (světlo). Luminiscence je proces emise fotonů formou studeného světla, vznikajícího návratem elektronů z excitovaného stavu do základního energetického stavu za nízkých teplot (Goldberg &

Weiner, 1989). Energie chemických reakcí je využita k tvorbě světla, tzv. chemiluminiscenci. Míra světla produkovaného fotochemickou reakcí je přímo úměrná koncentraci jednotlivých reaktantů (Aslan & Geddes, 2009). Základním principem chemiluminiscence je oxidace luminoforu silným oxidačním činidlem. Luminofor je organická sloučenina umožňující vlastní chemickou excitaci a následné vyzáření energie ve formě světla.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Kosmetika, kosmetické přísady, ingredience a konzervanty

Před uvedením nové kosmetické přísady na trh musí výrobci stanovit její bezpečnostní profil, zejména posoudit potenciál sensibilizace kůže, což je povinný požadavek pro topické aplikace. Od zákazu testování na zvířatech v Evropě v roce 2013 nařízení ES č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích uvádí seznam látek zakázaných v kosmetických přípravcích (příloha II) a látky, které mohou být obsaženy v kosmetických přípravcích při dodržení stanovených omezení (příloha III, IV, V, VI). Toxikologické vlastnosti složených směsí, mezi které patří finální kosmetické přípravky, závisí nejen na toxikologických vlastnostech jednotlivých složek, ale také na jejich kombinovaných interakcích, a to i při použití v nízkých či bezpečných koncentracích. V závislosti na biologické dostupnosti, typu a četnosti expozice mohou výsledky testů *in vitro* vést k predikci účinků na vyšší biologické úrovni a neměly by být podceňovány.

#### 4.1.1 Parfémy

Kosmetické parfémy představují chemické směsi obsahující složky syntetického i přírodního původu. Komponenty jsou seřazeny v sestupném pořadí podle jejich procentuálního zastoupení v konečném objemu. Kvalita a bezpečné koncentrace jednotlivých složek jsou předpokladem pro bezpečný finální kosmetický produkt.

Jednou z velmi důležitých součástí kosmetických přípravků, které mohou být z toxikologického hlediska potenciálně nebezpečné, jsou směsi vonných látek, obvykle složené z komplexních aromatických nebo fenolických sloučenin, dále pak syntetické vůně, éterické oleje či rozpouštědla (Steineman *et al.*, 2011). V závislosti na procentuální koncentraci vonných látek ve finální formulaci parfémového produktu se rozlišuje: parfém (P) 15-40 % vonných složek, parfémovaná voda (EdP) 8-15 %, toaletní voda (EdT) 4-8 % a kolínská voda (EdC) 3-5 %.

V nedávné době byly zaznamenány případy zdravotních problémů při používání parfémů, především se jednalo o podráždění a sensibilizaci kůže, bolesti hlavy nebo astmatické záchvaty, a to převážně u spotřebitelů s citlivou pokožkou nebo s predispozicí ke kožní či respirační alergii (Steineman, 2017; Basketter *et al.*, 2019).

V rámci studie bylo na trhu EU zakoupeno 10 produktů reprezentujících kosmetické parfémy (P, EdP, EdT, EdC a 1 deodorant). Vzorky 1 – 6 byly zakoupeny prostřednictvím

běžné maloobchodní sítě. Vzorky 7 a 8 byly zakoupeny prostřednictvím internetového prodeje neznačkových produktů, vzorek 9 prostřednictvím přímého katalogového prodeje a vzorek 10 prostřednictvím online prodeje originální značkové řady distribuované velkoobchodními kanály.

Testované vzorky byly připraveny jako zásobní roztoky rozpuštěné v DMSO a dále ředěny dle kapitoly 3.1.2 v D-MEM. Celkem bylo hodnoceno 6 koncentrací od každého výrobku ve dvou opakováních.

Tab. 1: Charakterizace a výsledky parfémů použitých pro studii

Vzorek	Typ produktu	Země původu	LuSens (DMSO)
1	EdP	EU	-
2	EdP	UAE	-
3	EdP	CHINA	-
4	EdP	EU	-
5	Deodorant	EU	-
6	EdP	KSA	+
7	P	EU	+
8	P	EU	+
9	EdT	EU	+
10	EdC	EU	-

Výsledky jsou rozděleny do 2 kategorií: - negativní výsledek, + pozitivní výsledek (alespoň v 1 koncentraci byla zaznamenána indukce luciferázové aktivity  $\geq 1,5$  proti kontrole a současně životaschopnost buněk dosahovala alespoň ve 3 koncentracích  $\geq 70$  %).

Vzorek číslo 2 vykazoval významný cytotoxický efekt v koncentracích 25 – 100  $\mu\text{g/ml}$ , ovšem sensibilizační potenciál vzorku v nižších koncentracích, které splnily kritéria viability buněk  $\geq 70$  %, nebyl prokázán. Čtyři vzorky z testovaného souboru (vzorky 6, 7, 8, 9) poskytly pozitivní odpověď. Vzorek 6 odhalil sensibilizační potenciál ve třech testovaných koncentracích (25 – 50 – 100  $\mu\text{g/ml}$ ), vzorek 7 poskytl pozitivní odpověď ve dvou koncentracích (50 a 100  $\mu\text{g/ml}$ ) a vzorek 8 vykazoval pozitivní odezvu pouze v jedné z testovaných koncentrací (100  $\mu\text{g/ml}$ ), přičemž v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  byla hodnota těsně

pod hranicí positivity. Vzorek 9 vykazoval pozitivní odezvu pouze v jedné z koncentrací (100 µg/ml).

#### 4.1.2 Diskuze

Testování kosmetických prostředků na zvířatech bylo zakázáno, apožaduje se, aby byly tyto zkoušky nahrazeny jednou nebo více validovanými alternativními metodami. Testování na lidských dobrovolnících u látek vzbuzujících toxikologické obavy je z etického hlediska také nepřijatelné. Z tohoto důvodu zůstává použití toxikologických metod *in vitro*, založených na primárních lidských buněčných liniích nebo tkáních, vhodným přístupem k posouzení zdravotních rizik.

Kosmetické přípravky s obsahem různých ingrediencí představují málo definované směsi, ve kterých mohou být kombinované různé účinky všech složek přítomných ve finálním produktu. Bohužel je dosti problematické posuzovat, která jednotlivá složka je zodpovědná za jaký biologický účinek. Zvláštní pozornost je třeba věnovat hodnocení místní toxicity (podráždění kůže a očí), senzibilizaci kůže a v případě absorpce UV zářením také fotoindukované toxicity (EU, 2017a).

Na základě několika studií byly deodoranty a parfémy shledány jako nejrizikovější kategorie produktů z hlediska senzibilizace kůže a kontaktních alergií. Podle nařízení (ES) č. 1223/2009 musí být jakýkoli kosmetický přípravek dostupný na trhu za běžných podmínek použití bezpečný pro lidské zdraví. Příloha III tohoto nařízení obsahuje seznam zakázaných kosmetických přísad, jejichž použití je omezeno několika podmínkami, například maximální povolenou koncentrací ve výrobcích nebo povinným označením v seznamu přísad (Lamas et al., 2010; EU, 2017a). Je definováno 26 vonných látek (Cinamal, Geraniol, *Evernia prunastri*, Cinnamyl alcohol, Eugenol, Hydroxycitronellal, Isoeugenol,  $\alpha$ -Amyl cinnamal, Citral, Coumarin, Hydroxyisohexyl 3-cyclohexane carbaldehyde, Citronellol,  $\alpha$ -Hexylcinnamal, Farnesol, Benzyl alcohol, Benzyl salicylate, Linalool, Limonene, Butylphenyl methylpropional, Anisyl alcohol, Benzyl cinnamate, Benzyl benzoate, Methyl-2-octynoate,  $\alpha$ -Isomethyl ionone, *Evernia furfuracea*, Amyl cinnamal), které musí být specifikovány na etiketách kosmetických výrobků, pokud jsou přítomny v koncentracích 0,001 % (u produktů používaných bez oplachování) a 0,01 % (u produktů používaných s oplachováním) (Arribas et al., 2012).

V dnešní době se jako vonné složky používá přibližně 3000 látek (Cuesta et al., 2010). Přestože jsou vonné látky rozšířenými alergeny, se kterými přichází do styku téměř celá populace, procento jedinců alergických na vůně je relativně nízké. Kontaktní alergie na vonné složky i mimo kosmetiku, především z výrobků požívaných v každodenním životě (tj. prací prostředky, aviváže, aromaterapeutické oleje a další domácí chemie) patří mezi zcela běžnou a postihuje až 3 % evropské populace (Arribas et al., 2012; Wieck et al., 2018). Frekvence alergie na vonné látky je u dětí nižší a zvyšuje se s věkem, pravděpodobně kvůli opakované expozici v průběhu života (Thyssen et al., 2009).

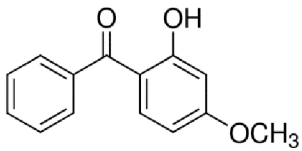
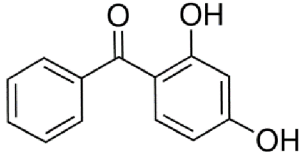
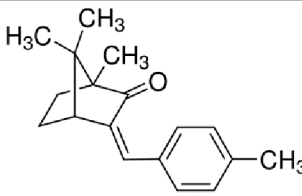
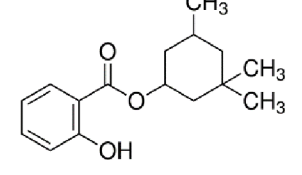
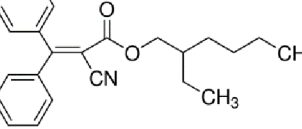
Metody *in vitro* by měly být zahrnuty do baterie toxikologických testů při screeningu vlastností kosmetických přípravků a jejich složek v oblasti veřejného zdraví a ochrany spotřebitele. Tyto metody vyvinuté na základě dráhy AOP mohou odhalit nové toxikologické vlastnosti a poskytnout cenné údaje o jejich mechanickém základě, což může přispět k objasnění mechanismů a specifických interakcí jednotlivých složek finálního kosmetického výrobku. Interakce jednotlivých složek mohou vést k celkové biologické odpovědi, i když koncentrace jednotlivých ingrediencí jsou považovány za bezpečné. Z etického důvodu se proto nabízí použití *in vitro* toxikologických přístupů relevantních pro člověka, tj. bez použití laboratorních zvířat, jako první krok před testováním na lidských dobrovolnících.

#### 4.1.3 UV filtry

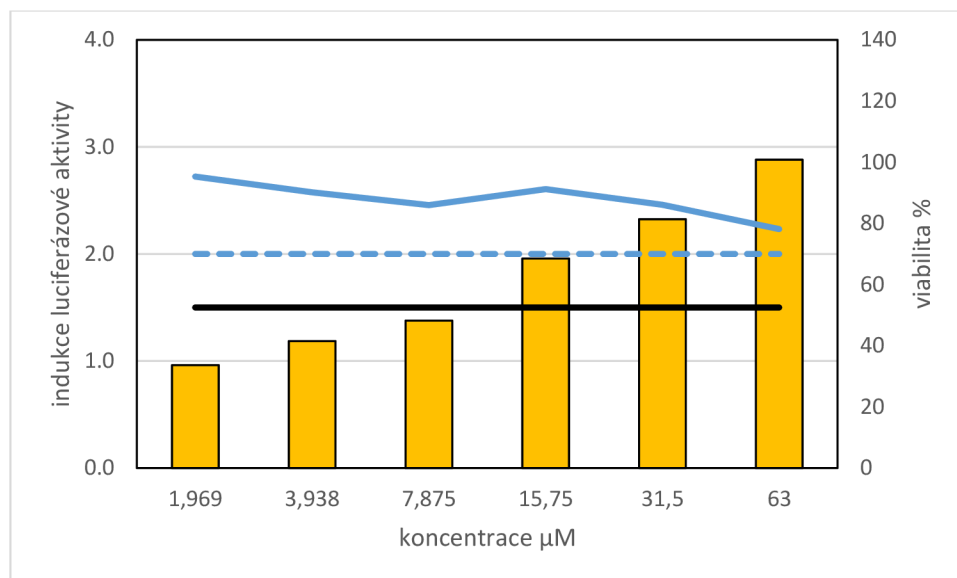
UV filtry (UVF) jsou součástí opalovacích krémů a používají se k ochraně pokožky před slunečním zářením. V rámci posledních let jsou začleňovány i do jiné kosmetiky denní potřeby. Bylo však vzneseno mnoho obav o jejich bezpečnosti, jelikož UV filtry mohou být absorbovány kůží a pak dále metabolizovány, případně bioakumulovány. Tyto procesy perkutánní absorpce mohou mít za následek různé nepříznivé zdravotní účinky, např. ACD a další závažnější systémové účinky, jako je karcinogenita či estrogenní aktivita. Z tohoto důvodu jsou maximální povolené koncentrace regulovány platnou legislativou a je zapotřebí vytvoření jejich toxikologického profilu, aby byla zajištěna jejich účinnost a současně bezpečnost v kosmetických prostředcích.

Bylo vybráno celkem pět látek (Tab. 2) reprezentujících UVF v opalovacích krémech pro ověření bezpečnosti z hlediska kožní sensibilizace.

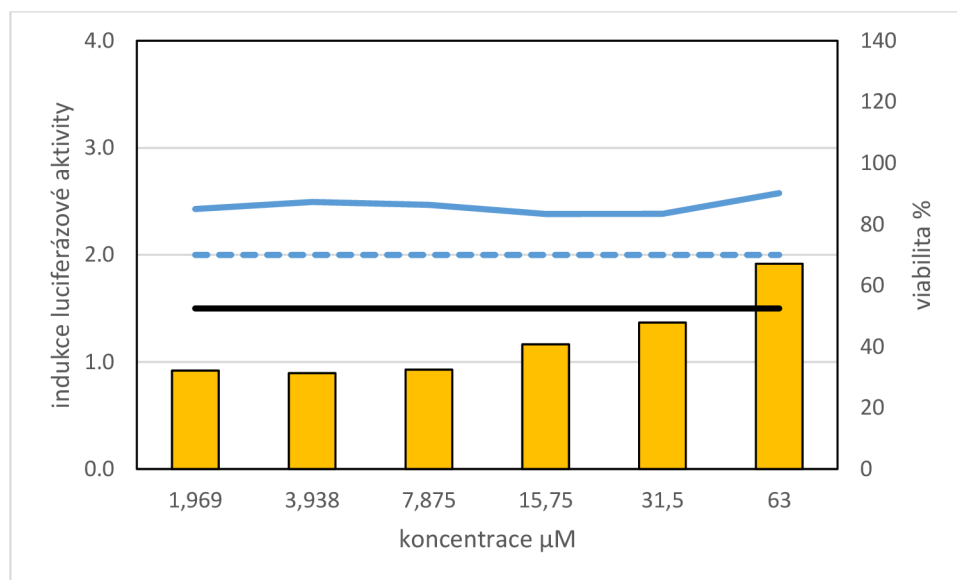
Tab. 2: Pět testovaných látek reprezentujících UVF (Sigma-Aldrich).

UVF	Sigma-Aldrich (CAS)	Chemická struktura
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	131-57-7	
2,4-Dihydroxybenzophenone	131-56-6	
3-(4-Methylbenzylidene)camphor	36861-47-9	
Homosalate	118-56-9	
Octocrylene	6197-30-4	

Testované vzorky byly připraveny jako zásobní roztoky rozpuštěné v DMSO a dále ředěny dle kapitoly 3.1.2 v D-MEM. Celkem bylo hodnoceno 6 koncentrací. Výsledky jsou uvedeny v grafech (1-5), žluté sloupce reprezentují hodnotu indukce luciferázové aktivity jednotlivých vzorků a černá plná čára představuje hraniční hodnotu indukce luciferázové aktivity (1,5násobek). Modrá čára reprezentuje životaschopnost vzorků v použitých koncentracích a modrá přerušovaná čára představuje mezní hodnotu životaschopnosti (70 %).

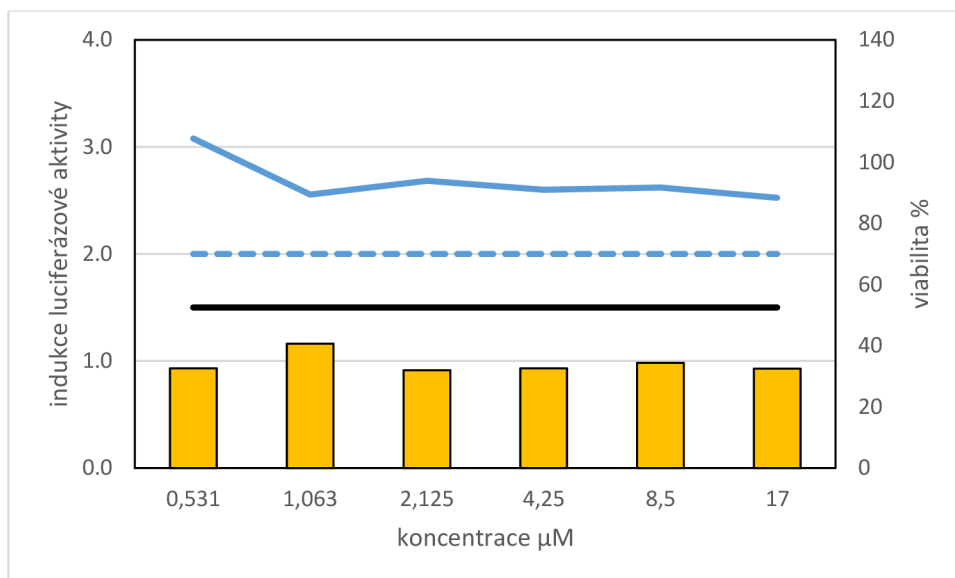


Graf. 1: 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone

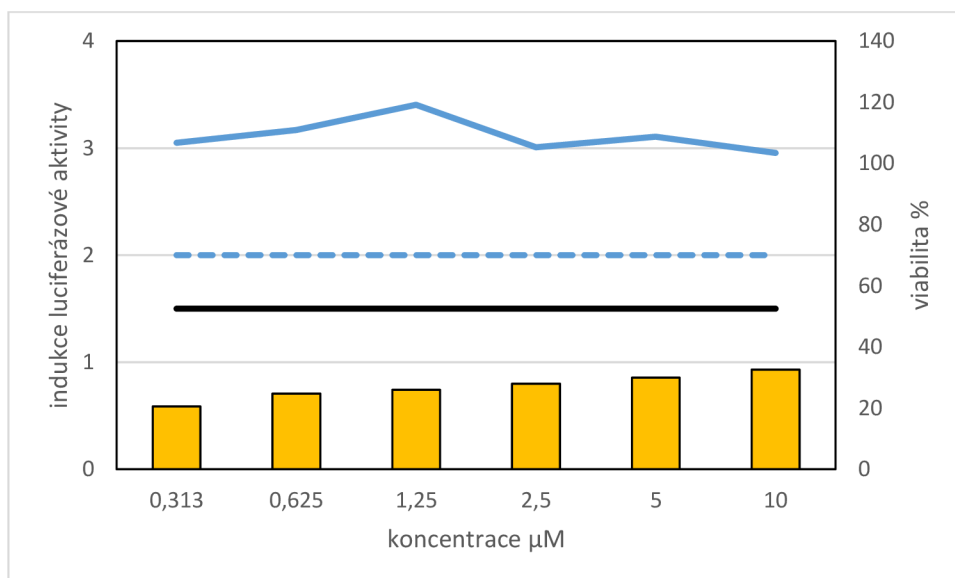


Graf. 2: 2,4-Dihydroxybenzophenone

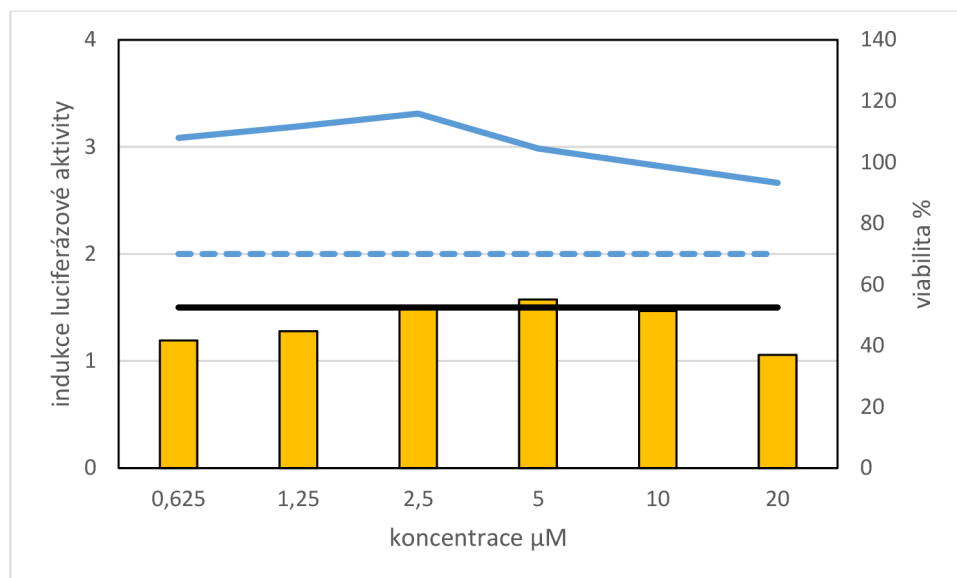




Graf. 3: 3-(4-Methylbenzylidene)camphor



Graf. 4: Homosalate



Graf. 5: Octocrylene

Tři UVF (2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone, 2,4-Dihydroxybenzophenone a Octocrylene) z pěti vybraných pro ověření bezpečnosti z hlediska kožní sensibilizace vykazovaly potenciál kožní sensibilizace. Vzorek 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone odhalil sensibilizační potenciál ve třech testovaných koncentracích (15,75 – 31,5 – 63  $\mu\text{M}$ ), vzorek 2,4-Dihydroxybenzophenone poskytl pozitivní odpověď pouze v jedné z testovaných koncentrací (63  $\mu\text{M}$ ) a Octocrylene vykazoval pozitivní odezvu ve třech testovaných koncentracích (2,5 – 5 – 10  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.1.4 Diskuze

Opalovací krémy obsahují jeden nebo i více UV filtrů a mnoho dalších látek (např. změkčovadla, konzervační látky, stabilizátory, emulgátory, vůně či barviva). UVF jsou specifické sloučeniny, které brání průchodu ultrafialového záření skrze pokožku. Dermatologové je rozdělují na chemické (absorbující UV paprsky a přeměňující se na tepelnou energii) a fyzikální (odrážející UV paprsky). Chemici kategorizují UVF jako organické vs. anorganické, lipofilní vs. hydrofilní. Databáze Národní lékařské knihovny (National Library of Medicine, NLM) tyto sloučeniny uvádí pod označením sluneční clony a definuje je jako chemické nebo fyzikální látky, které chrání pokožku před spálením či erytémem tím, že absorbují nebo blokují ultrafialové záření. UVF se používají také ve spotřební kosmetice (např. make-upy, laky na nehty, šampony) a v průmyslu (např. plasty, barvy, tmely) k ochraně před fotodegradací.

Opalovací krémy s obsahem UVF mohou způsobit alergickou kontaktní dermatitidu. Oxybenzone, chemický UVA filtr, je nejběžnější složka opalovacích krémů způsobující podráždění, až alergickou kontaktní nebo foto-kontaktní dermatitidu. PABA byl běžným alergenem v opalovacích krémech, který byl zakázán, a dnes ho ve složení opalovacích krémů nenajdeme. Další látky, které prokazatelně způsobují foto-alergické reakce, jsou cinnamáty, dibenzoylmethany a benzofenony (Sabzevari *et al.*, 2021). Dalším příkladem může být Octocrylene, čirá olejová organická sloučenina, která je využívána při výrobě opalovacích přípravků. Patří do skupiny derivátů kyseliny skořicové (cinnamátů) a v produktu působí jako chemický UVF, který se vstřebává do pokožky, pohlcuje škodlivé UV paprsky a přeměňuje je na teplo. Octocrylene absorbuje UV záření v celém spektru UVB a v malé části UVA. Je používán v běžné kosmetice a jeho maximální povolená koncentrace je 10 % (SCCS, 2021b) SCCS stanovil, že maximální koncentraci 2,2 % 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (Benzofenonu-3) jako UV filtru lze považovat za bezpečnou v tělových krémech, hnacích sprejích a sprejích s pumpičkou. V těchto typech opalovacích přípravků se Benzofenon-3 používá v koncentraci 0,5 % v ochranné formulaci. Koncentrace této složky jako UV filtru by však neměla překročit 1,7 % (SCCS, 2020a). Podobně použití homosalátu, jako UV filtru v kosmetických přípravcích, je pro spotřebitele bezpečné v maximální koncentraci 1,4 % v konečném výrobku (SCCS, 2020b). 4-Methylbenzylidene camphor (4-MBC) se používá pro ochranu spotřebitele v opalovacích krémech v koncentraci 0,5 % a nižší. Kromě toho lze 4-MBC použít k zajištění UV ochrany v produktech denní péče o pleť (pleťové krémy/mléka, atd.), které mají vlastnosti vhodné k ochraně proti UV záření, koncentrace pro toto použití se pohybuje od velmi nízké až po maximální tj. 4% (SCCS, 2008).

Dráždivé látky, alergeny, fotoalergeny i opalovací kosmetika celkově, to vše tvoří položky, které je třeba vzít v úvahu při doporučení správné ochrany před sluncem. V této práci některé UV filtry byly v rámci testování metodou LuSens potvrzeny jako potenciální senzibilizátory kůže, proto lze obecně doporučit se slunci raději vyhýbat a používat ochranné oděvy, než aplikovat na pokožku nadměrné množství kosmetických přípravků s UVF.

#### **4.1.5 Koloranty – Ftalocyaniny**

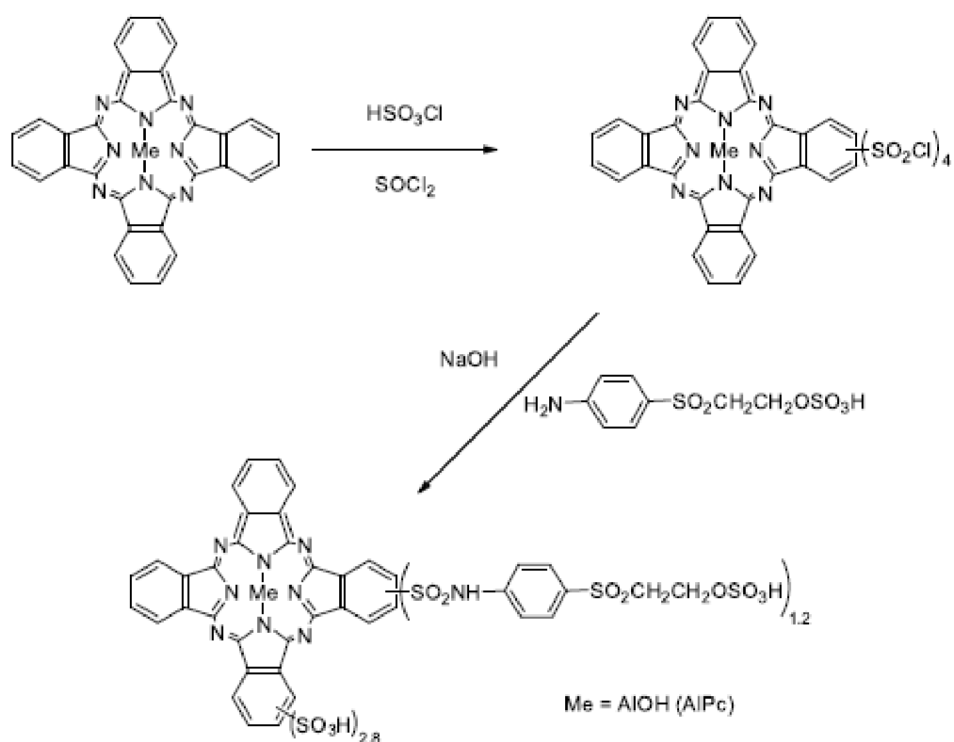
Ftalocyaniny (PCs) jsou aromatické molekuly s 18  $\pi$ -elektrony makrocyclického charakteru, skládající se ze čtyř isoindolinových jednotek. Makrocyclický systém rozhoduje o spektrálních vlastnostech (absorpční spektrum), centrálně chelátované kationty o způsobu,

jakým bude absorbovaná energie uvolněna. Připojení postranních skupin pak může výrazně ovlivnit rozpustnost v různých médiích, od nepolárních organických rozpouštědel až po vodu. Tím lze optimalizovat vlastnosti látek pro různé aplikace. Díky rozsáhlému systému konjugovaných vazeb tyto látky silně absorbují světlo v oblasti vlnových délek 600–700 nm, jsou to tedy modrá až modrozelená barviva (Löbber, 2011).

Ftalocyaniny jsou strukturně příbuzné přírodním pigmentům, ale na rozdíl od přírodních pigmentů s omezenou stabilitou jsou ftalocyaniny velmi stabilní organická barviva (Christie, 2015). Poprvé byly popsány v roce 1907 při syntéze 2-kyanobenzamidu jako modře zbarvený vedlejší produkt neznámého složení. Důkladnějšího studia se jim dostalo v třicátých letech 20. století a v roce 1933 byl poprvé použit pojem ftalocyanin (Löbber, 2011).

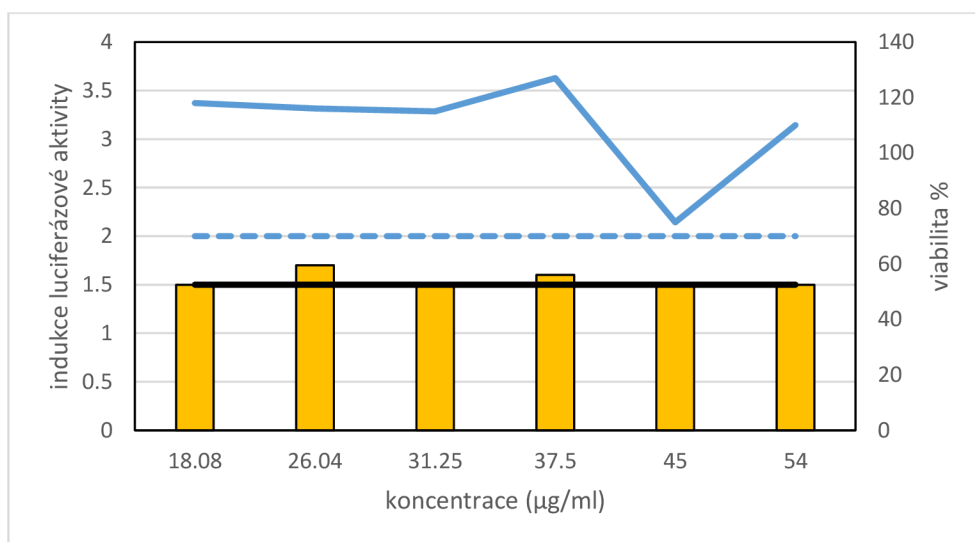
Ftalocyaniny našly široké uplatnění, zejména v textilním průmyslu, automobilovém průmyslu, v náplních do tiskáren, při výrobě CD disků a dalších aplikacích, jelikož se jedná o levnou obdobu organických pigmentů (Löbber, 2011). Barevnost však není jejich jedinou významnou vlastností, mají též účinky fototoxické a antimikrobiální. Absorbují světlo o vyšších vlnových délkách, čehož se využívá v léčbě nádorových onemocnění postupem známým jako fotodynamická terapie (Kolarova *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2019). Tato metoda využívá cytotoxického efektu na savčí buňky, jenž nastane při kombinaci tří složek – léčiva, světla a kyslíku. Léčivo, nazývané fotosensitizer, absorbuje světelné záření. Čím delší vlnová délka (až 800 nm), tím hlouběji světlo proniká do cílových tkání.

Cílem studie bylo podrobit nový a účinný antimikrobiální derivát ftalocyaninu AlPc toxikologickému hodnocení, zahrnujícímu výhradně alternativní metody bez použití zvířat. Testovaná sloučenina (AlPc) byla syntetizována a charakterizována Centrem organické chemie s. r. o, Pardubice, Česká republika (Obr. 7).



Obr. 7: Schéma přípravy AIPc dvoukrokovou reakcí pro reaktivní barviva

Žluté sloupce reprezentují hodnotu indukce luciferázové aktivity a černá plná čára představuje hraniční hodnotu indukce luciferázové aktivity (1,5násobek). Modrá čára reprezentuje životaschopnost vzorku ve zvolených koncentracích a modrá přerušovaná čára představuje hraniční hodnotu životaschopnosti (70 %).



Graf. 6: AIPc

Výsledky této práce prokázaly, že AIPc vyvolal u testu kožní sensibilizace *in vitro* hraniční sensibilizační potenciál (Graf. 6), avšak ve studii kožní absorpce/penetrace bylo prokázáno, že tato látka neproniká skrze epidermis a dermis, tudíž je riziko vzniku sensibilizace téměř zanedbatelné.

#### 4.1.6 Diskuze

Pro antimikrobiální aplikaci na různé podklady je výhodné trvale fixovat účinný ftalocyaninový fotosensitizer na daný materiál. V případě bavlněných tkanin je běžným postupem využití reaktivních ftalocyaninových barviv. Barvivo je za alkalických podmínek snadno navázané na nemodifikovanou bavlnu. Reaktivní skupiny (Pcs) jsou v současné době široce používány pro barvení textilních materiálů, a mají extrémně nízké fotosensibilizační vlastnosti. Tyto materiály obsahují určité množství anorganických solí (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a také zbytky výchozích složek, jako jsou aromatické aminy. Strategie byla přijata Sevim *et al.*, 2011, kteří připravili řadu Pcs nesoucích 4-(karboxymethylsulfanylové) skupiny, které byly následně vázány na bavlnu s kationtovou modifikací. Výsledná látka vykazovala dobrou stálost vůči vodě a praní.

V rámci předchozího projektu MPO Martinková *et al.*, 2016, byla připravena série 14 Pcs pro reaktivní barvení bavlněných látek. Barvené textilie byly testovány na stálobarevnost několika mezinárodními standardními metodami. Bylo prokázáno, že nejstabilnější vzorky vykazovaly dobré výsledky fotoaktivity (sulfovinylové Pcs). Dvě nejstabilnější barvené textilie prokázaly vysoký a spolehlivý antimikrobiální účinek proti G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriím, a to i po opakovaném praní při 60 °C. Předpokladem bylo, že materiál bude vyráběn ve velkém měřítku pro použití ve zdravotnickém průmyslu, např. na obličejové masky, ložní prádlo nebo pracovní oděvy pro lékaře a sestry.

Na základě těchto skutečností bylo rozhodnuto podrobit testům toxicity nejúčinnější Pcs pro potvrzení, že nevykazuje žádná neočekávaná zdravotní rizika pro pracovníky v textilních továrnách, pacienty, popřípadě další uživatele. Tento upravený AIPc materiál nemá čistotu obvyklou pro testy toxicity, na druhou stranu představuje skutečný materiál, který je plánován pro výrobu ve velkém měřítku, kde vysoká čistota není vyžadována.

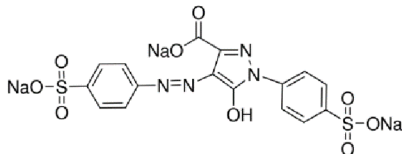
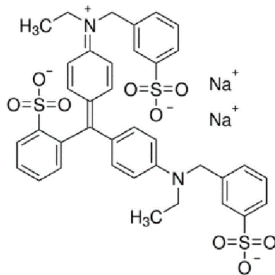
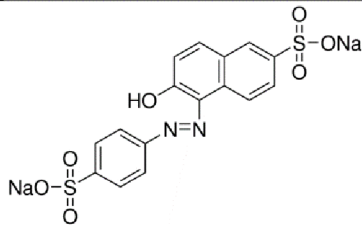
#### 4.1.7 Koloranty – Azobarviva

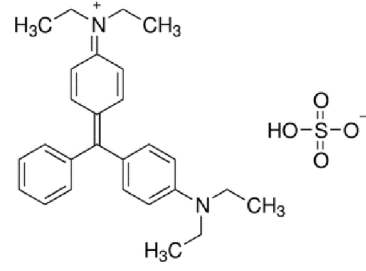
V roce 1881 byla umělá barviva poprvé použita v potravinových výrobcích (Downham & Collins, 2000). V roce 1900 pak bylo barvení potravin umělými barvivy už poměrně

běžné. V současné době tvoří azobarviva přibližně 50 % všech organických barviv používaných v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu či medicíně (Coulate & Blackburn, 2018). Od 20. století byl v mnoha zemích prosazen regulační dohled nad azobarvivy, používanými jako koloranty, a bylo u nich provedeno velké množství toxikologických studií (Lehto *et al.*, 2017). Přesto je stále obtížné určit jejich potenciální dopad na lidské zdraví. Tradiční studie toxicity azobarviv byly prováděny *in vivo*, na modelových organismech potkana a myši. Tyto studie byly zaměřeny především na imunologické, sérologické, biochemické a histopatologické end-pointy (Elbanna *et al.*, 2017; Hashem *et al.*, 2010).

Právě z tohoto důvodu jsme se zaměřili na oblast, která doposud nebyla dostatečně prozkoumána, a to na toxikologické hodnocení bezpečnosti *in vitro*. Byla vybrána čtyři azobarviva (Tab. 3), kdy jedním s testovaných ukazatelů byla právě kožní sensibilizace.

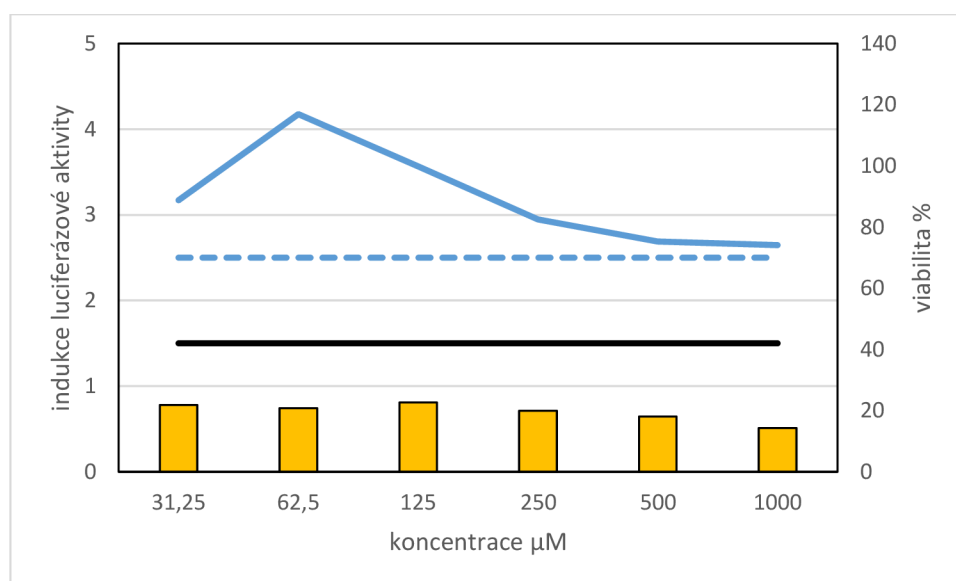
Tab. 3: Čtyři testované látky reprezentující azobarviva - koloranty (Sigma-Aldrich).

Azobarvivo	Sigma-Aldrich (CAS)	Chemická struktura
Tartrazine	1934210	
Brilliant blue	3844459	
Sunset yellow	2783940	

Brilliant green	633034	
-----------------	--------	---

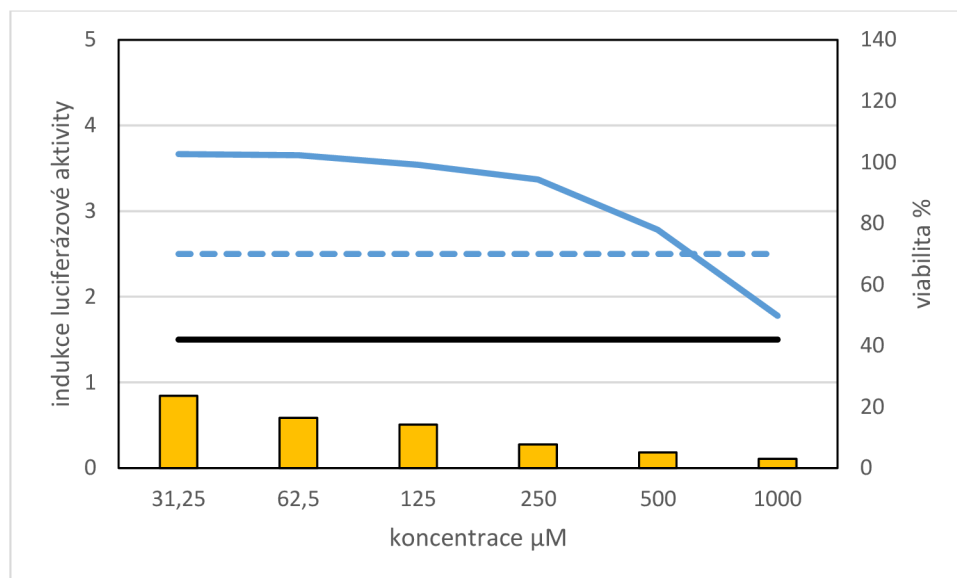
Testované vzorky byly připraveny jako zásobní roztoky rozpuštěné v DMSO a dále ředěny dle kapitoly 3.1.2 v D-MEM. Celkem bylo hodnoceno 6 koncentrací (Graf. 7-10).

Žluté sloupce reprezentují hodnotu indukce luciferázové aktivity a černá plná čára představuje hraniční hodnotu indukce luciferázové aktivity (1,5násobek). Modrá čára reprezentuje životaschopnost vzorků ve zvolených koncentracích a modrá přerušovaná čára představuje hraniční hodnotu životaschopnosti (70 %).

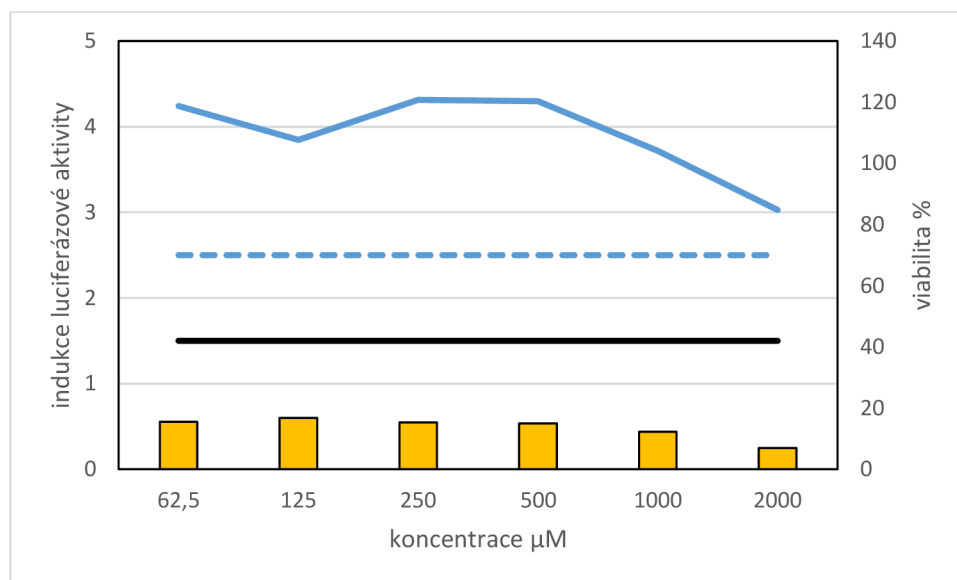


Graf. 7: Tartrazine

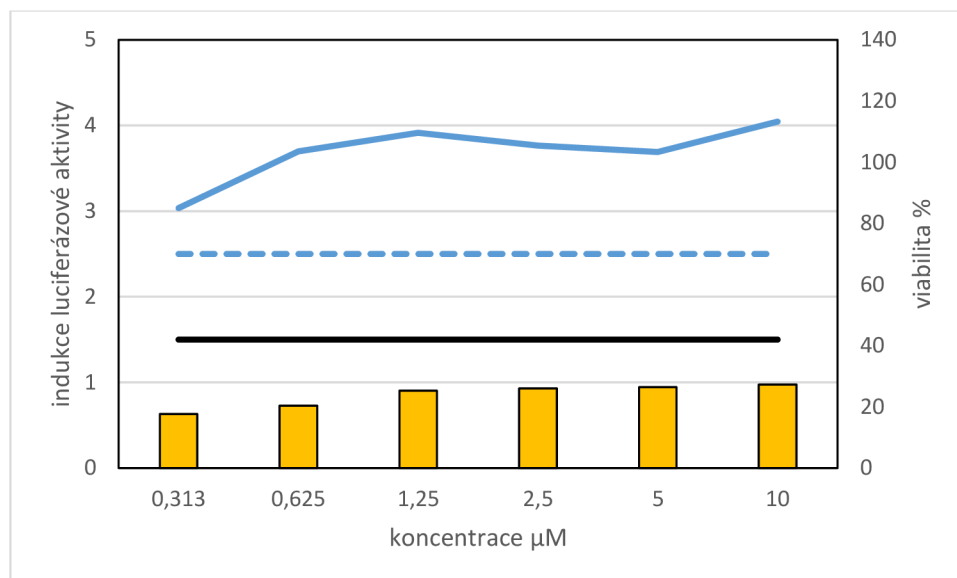




Graf. 8: Brilliant blue



Graf. 9: Sunset yellow



Graf. 10: Brilliant green

Žádné z výše testovaných azobarviv nevykazovalo sensibilizační potenciál pro kůži. Pouze Brilliant green ve vyšších koncentracích vykazoval cytotoxický efekt, ovšem v necytotoxických koncentracích (10 – 0,313  $\mu\text{M}$ ) s životností  $\geq 70\%$  sensibilizační potenciál prokázán nebyl.

#### 4.1.8 Diskuze

Syntetická azobarviva jsou široce používána v průmyslu. Některá azobarviva mohou být karcinogenní, aniž by se štěpila na aromatické aminy. Karcinogenita mnoha azobarviv je však způsobena jejich štěpným produktem, jako je benzidin. Benzidin vyvolává různé lidské a zvířecí nádory. Další složka azobarviv, p-fenylendiamin, je kontaktním alergenem. Uvádí se, že mnoho azobarviv a jejich redukčně štěpených produktů, jakož i chemicky příbuzných aromatických aminů ovlivňuje lidské zdraví a způsobuje alergie (Chung, 2016). Používání těchto chemických látek zvyšuje pravděpodobnost expozice, a to buď požitím, nebo průchodem přes kůži. Otázka expozice je důležitá, jelikož na základě dříve provedených výzkumů bylo prokázáno, že existuje vztah mezi dlouhodobou expozicí těmto látkám a rozvojem intraorální alergické dermatitidy nebo stomatitidy (Torgerson *et al.*, 2007; Feller *et al.*, 2017). Z tohoto důvodu je nutné zhodnotit potenciál azobarviv používaných v potravinách, kosmetických přípravcích, hračkách a dalších výrobcích přicházejících do styku s kůží a sliznicemi, z hlediska sensibilizace.

Důležitá je především včasná identifikace rizikových faktorů spojených se spotřebitelským používáním výrobků každodenní potřeby. Mezi hlavní riziko patří látky se

sensibilizujícím potenciálem s negativním dopadem na fyzické a psychické zdraví člověka, se sociálními a společenskými důsledky (Tomankova *et al.*, 2011).

Hlavně v potravinářském průmyslu se používají potravinářská barviva (FC), tak aby byly potraviny pro spotřebitele přitažlivější a rozmanitější. Nežádoucí účinky spojené s konzumací FC, včetně reakcí vyvolaných imunitním systémem (okamžitá či opožděná hypersenzitivní reakce) se vyskytují ojediněle. Doložené reakce jsou většinou mírné, postihují především kůži, jen vzácně se vyskytují anafylaktické reakce (Yamashita *et al.*, 2018). Azobarviva, tartrazin (E102) a sunset yellow (E110) jsou běžné přídatné potravinářské látky schválené pro používání, ale je jim věnována značná pozornost, protože existuje možnost, že vyvolávají prozánětlivou reakci. Ve studiích, týkajících se nežádoucích účinků azobarviv na zdraví člověka, byly zaznamenány u některých jedinců reakce popisované jako potravinové alergie, způsobující svědění, edém, kopřivku, astma nebo rýmu v důsledku požití potravinářského barviva tartrazinu. Na druhé straně, při dermálním testování tartrazinu, prováděném jako patch test, byly získány převážně negativní výsledky (SCCNFP, 2004). Shodou okolností jsou obě výše zmíněná barviva aryl azosloučeninami. Tyto aryl azosloučeniny mohou být redukčně štěpeny za vzniku aromatických aminů, které mohou být toxické, mutagenní či karcinogenní. Kyselina arachidonová (AA) je 20uhlíková polynenasycená mastná kyselina, která se nachází v savčích buňkách. AA může být přeměněna enzymatickými nebo neenzymatickými cestami na řadu okysličených metabolitů, souhrnně známých jako eikosanoidy, které se podílejí na zánětlivých a alergických procesech. AA může být oxygenována 5-lipoxygenázou za vzniku leukotrienu B<sub>4</sub> (Lotzer *et al.*, 2005). Leukotrien B<sub>4</sub> je silný chemoatraktant schopný rekrutovat leukocyty, neutrofilu, monocytu do míst zánětu a zesilovat tak zánětlivé reakce (Lotzer *et al.*, 2005). AA může také projít neenzymatickou peroxidací iniciovanou volnými radikály za vzniku F<sub>2</sub>-isoprostanů, které jsou stabilními *in vivo* markery oxidačního stresu (Sies *et al.*, 2017). V rámci *in vivo* pokusů barvivo sunset yellow způsobilo u 50 % testovaných zvířat zbarvení kůže do oranžova, díky čemuž nebylo možné určit, zda byl přítomen erytém, nicméně edém zaznamenaný nebyl (SCCNFP, 2004). Tartrazin obsažený v potravinových produktech tvoří univerzální béžovou až žlutou barvu, kterou lze dobře kombinovat s brilantovou modří (E133) nebo zelení (E142) pro vytvoření různých zelených odstínů potravin a nápojů, z tohoto důvodu je široce používán po celém světě (Leo *et al.*, 2018).

#### 4.1.9 Parabeny

Parabeny jsou skupina syntetických chemikálií široce používaných jako konzervační látky v různých spotřebních produktech. Zahrnují alkylové nebo arylové homology kyseliny p-hydroxybenzoové (PHBA). Mezi nejčastěji používané estery patří methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP) a butylparaben (BP) (OECD, 2020; Bledzka *et al.*, 2014; Darbre & Harvey, 2008). Parabeny jsou malé hygroskopické krystaly, které mají řadu výhodných vlastností, jako je vysoká chemická stabilita, odolnost vůči hydrolyze, stabilní rozmezí pH a také nízké výrobní náklady (Jewell *et al.*, 2007; Golden *et al.*, 2005; Soni *et al.*, 2005). Celosvětově představují tyto sloučeniny velmi oblíbené přísady, protože jsou bezbarvé, bez chuti, bez zápachu a biologicky odbouratelné, a protože nemění konzistenci ani barvu konečných produktů (Petric *et al.*, 2021). Od 20. let 20. století jsou parabeny nejoblíbenějšími syntetickými konzervanty používanými nejen v kosmetice, ale také v potravinách a farmaceutických výrobcích, a to pro jejich široké spektrum antimikrobiálních a antimykotických vlastností (Soni *et al.*, 2005, 2002, Matwiejczuk *et al.*, 2020; Petric *et al.*, 2021).

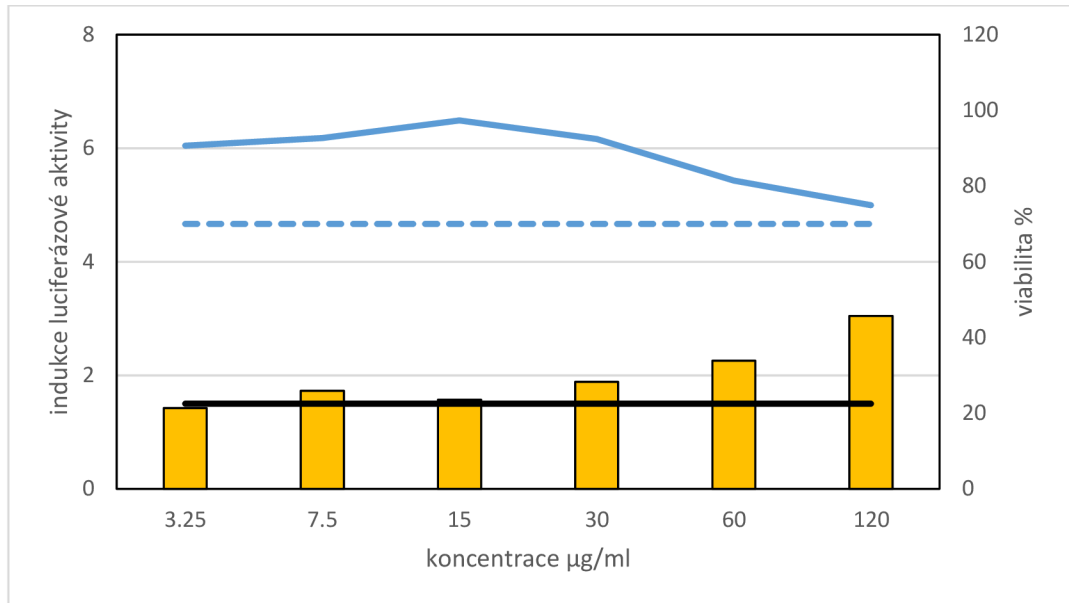
Pro účely studie byla zakoupena sada 7 esterů kyseliny p-hydroxybenzoové od Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI). Informace o testovaných vzorcích, včetně jejich zkratk, CAS čísel, molekulové hmotnosti a čistoty jsou shrnuty v Tab. 4.

Tab. 4: Charakteristika esterů kyseliny p-hydroxybenzoové vybraných pro testování

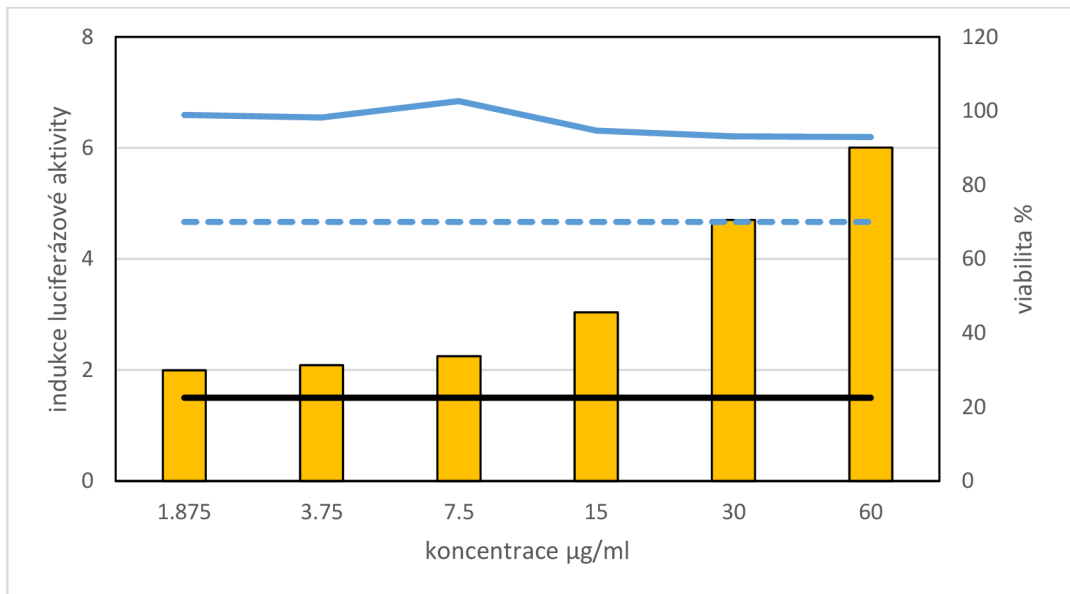
Vzorky	Zkratka	CAS	Molekulární hmotnost (g/mol)	Skupenství, čistota (%)
Methyl-4-hydroxybenzoate	MP	99-76-3	152.15	Prášek (>99)
Ethyl-4-hydroxybenzoate	EP	120-47-8	166.17	Prášek (>99)
Butyl-4-hydroxybenzoate	BP	94-26-8	194.23	Prášek (>99)
Isobutyl-4-hydroxybenzoate	IBP	4247-02-3	194.23	Prášek (>99)
Propyl-4-hydroxybenzoate	PP	94-13-3	180.20	Prášek (>99)
Isopropyl-4-hydroxybenzoate	IPP	4191-73-5	180.21	Prášek (>99)
Benzyl-4-hydroxybenzoate	BzP	94-18-8	228.24	Prášek (>99)

Výsledky zkoušky pro stanovení potenciálu sensibilizace vybraných parabenů metodu in vitro (LuSens) jsou uvedeny v grafech č. 11-17.

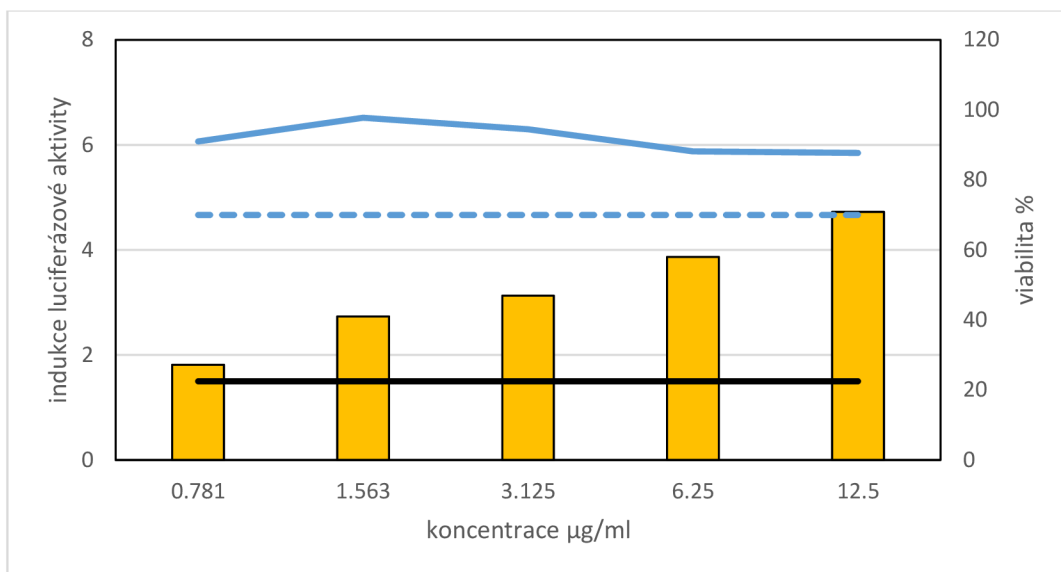
Žluté sloupce reprezentují hodnotu indukce luciferázové aktivity a černá plná čára představuje hraniční hodnotu indukce luciferázové aktivity (1,5násobek). Modrá čára reprezentuje životaschopnost vzorků ve zvolených koncentracích a modrá přerušovaná čára představuje hraniční hodnotu životaschopnosti (70 %).



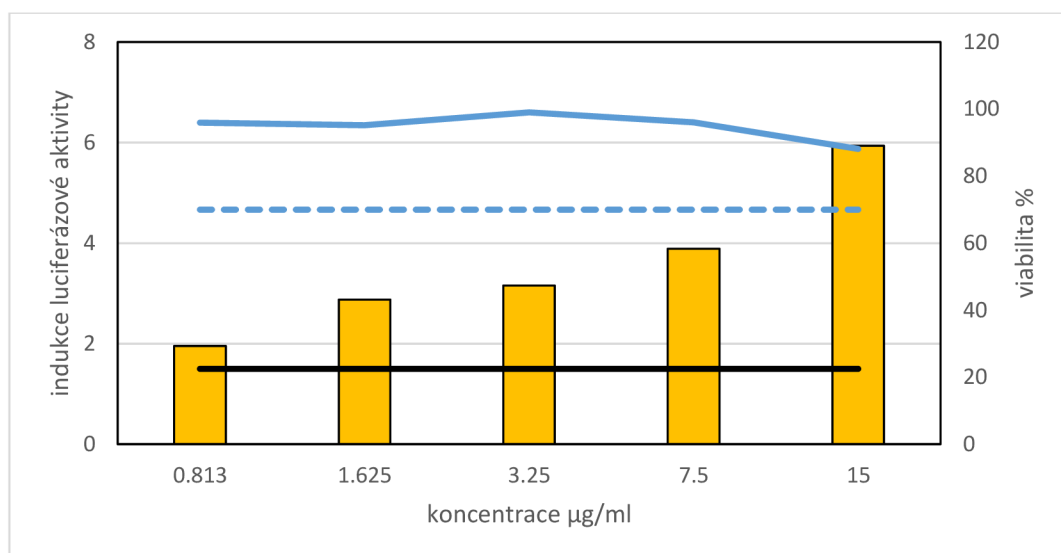
Graf. 11: Methyl-4-hydroxybenzoate



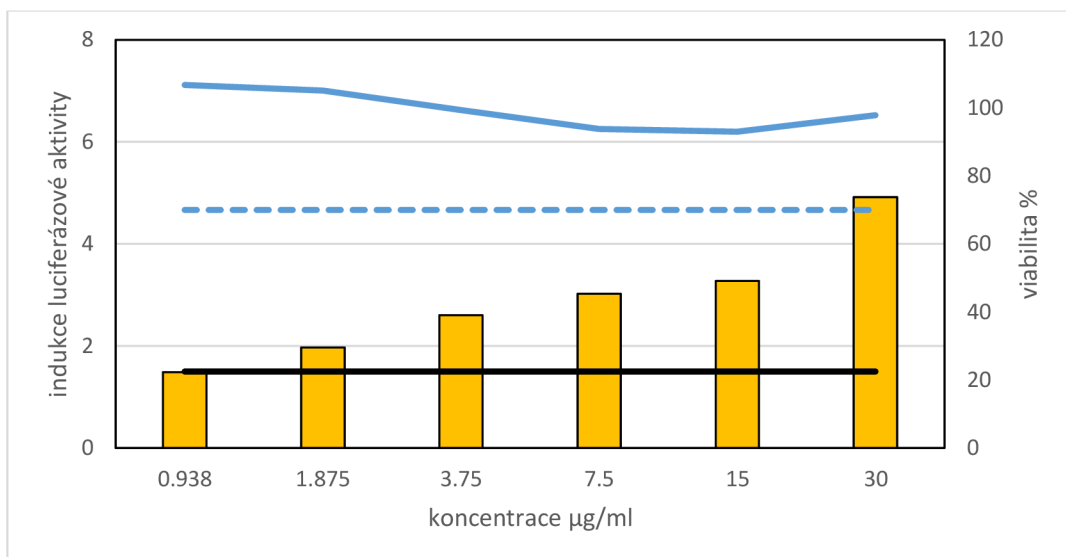
Graf. 12: Ethyl-4-hydroxybenzoate



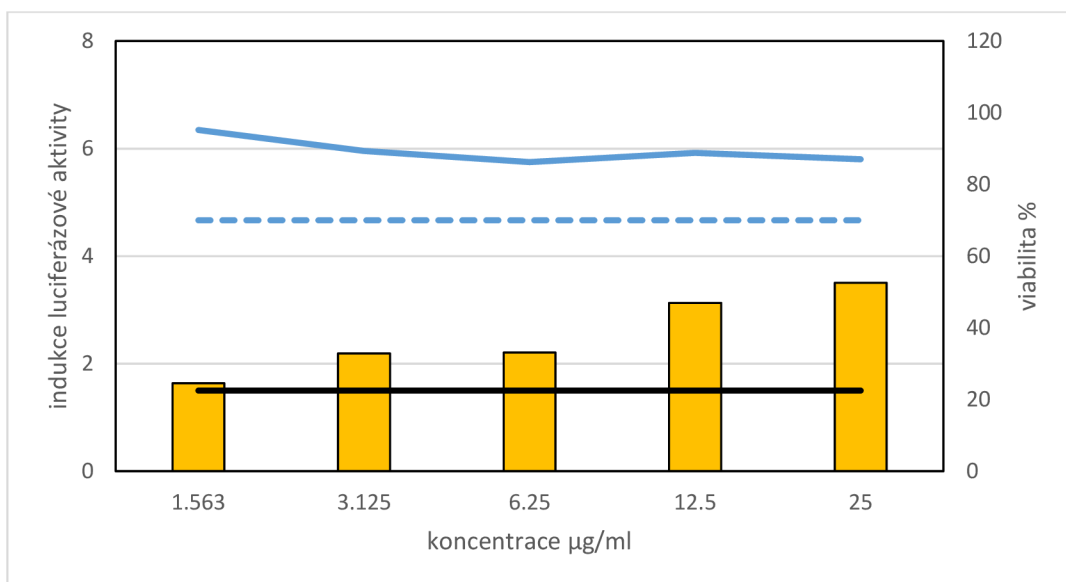
Graf. 13: Butyl-4-hydroxybenzoate



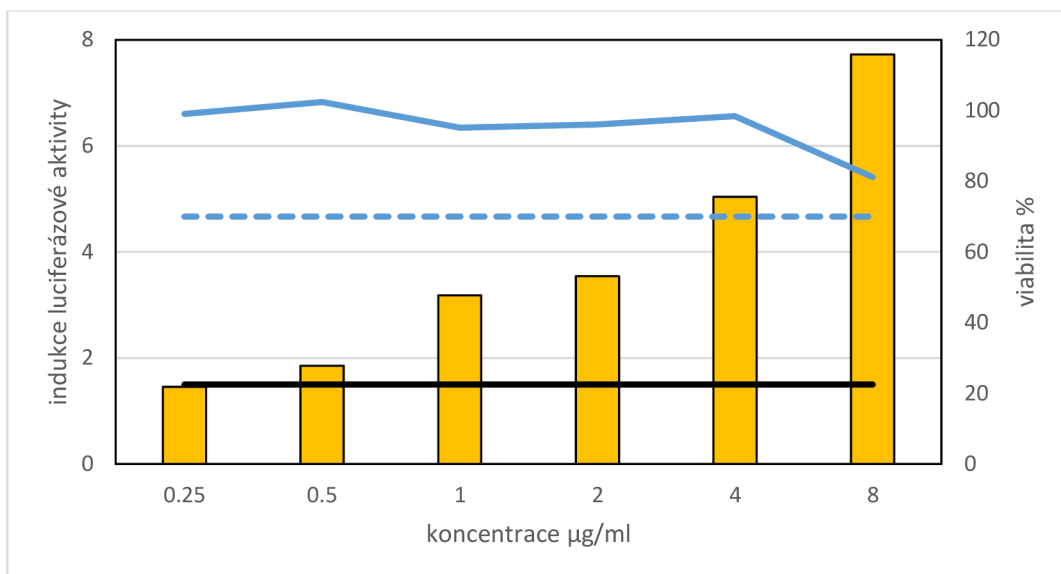
Graf. 14: Isobutyl-4-hydroxybenzoate



Graf. 15: Propyl-4-hydroxybenzoate



Graf. 16: Isopropyl-4-hydroxybenzoate



Graf. 17: Benzyl-4-hydroxybenzoate

LuSens test odhalil senzibilizační potenciál všech testovaných parabenů. Pozitivního výsledku bylo dosaženo z důvodu metabolické aktivace buněčné kultury, přičemž bylo dosaženo koncentrační závislosti indukce luciferázové aktivity. Jak je z grafů patrné, koncentrační závislost má klesající trend se snižující se koncentrací. Přestože byly použité koncentrace nadhodnoceny, s takovými koncentracemi se spotřebitel ve výrobcích běžně nesetká, je důležité přistupovat k nim s opatrností z hlediska hodnocení zdravotní bezpečnosti.

#### 4.1.10 Diskuze

Navzdory řadě studií publikovaných za posledních 40 let zůstává senzibilizační účinek parabenů na kůži kontroverzním tématem. Methyl- a propyl- paraben byly opakovaně klasifikovány jako nesenzibilizující v testu LLNA na myších (Soni *et al.*, 2005), zatímco četné studie založené na maximalizačním testu na morčatech poskytly nejednoznačné výsledky (Marzulli *et al.*, 1976, Andersen *et al.*, 1995). Obecně byla v literatuře zaznamenána senzibilizace způsobená parabenem především, pokud došlo k expozici poškozené či poraněné pokožky (Andersen, 2008). Podobně, jako v testech na finálních kosmetických přípravcích, obsahujících v rozmezí od 0,1 % do 0,8 % jednoho nebo kombinaci dvou parabenů, nebylo prokázáno významné podráždění nebo senzibilizační potenciál. Tyto údaje podporují bezpečnost parabenů pro lidské zdraví v povolených koncentracích v kosmetických přípravcích (Cherian *et al.*, 2020).



Současné hodnocení bezpečnosti parabenů se však opírá o dostupná historická data, často založená na experimentech *in vivo* provedených před desítkami let (Cherian *et al.*, 2020). S cílem zaplnit mezery ve výzkumu a ověřit historická data bylo podrobena testu sensibilizace sedm výše zmíněných parabenů.

Testované parabeny ve zvolených koncentracích vykazovaly sensibilizační potenciál v testu LuSens, což je v souladu s nedávnými studiemi Tourneix *et al.* (2020) a Vandecasteele *et al.* (2021), zaměřenými na čtyři strukturně podobné parabeny, které byly predikovány také jako pozitivní na buněčných liniích v testech KeratinoSens™ a U-SENS™.

V Evropské unii je povoleno používat kyselinu 4-hydroxybenzoovou a její soli a estery, jiné než estery isopropylu, isobutylu, fenylu, benzylu a pentylu, v maximálních koncentracích 0,4 % pro jednotlivé estery a 0,8 % pro směsi esterů v konečných produktech (EC, 2009; EC, 2014). Isopropyl-, isobutyl-, benzyl- a pentyl- paraben jsou v souladu s platnými předpisy EU v kosmetických přípravcích zakázány (EC, 2009). Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitelů (SCCS) doporučil, aby v kosmetických přípravcích určených pro styk s kůží v oblasti plen pro děti ve věku <3 let byly zakázány i butyl- a propyl- paraben (SCCS, 2021a). SCCS navíc stanovil maximální koncentrační limity 0,4 % pro methyl- a ethylparaben (jednotlivé estery a jejich soli) a 0,8 % pro směsi čtyř esterů (methyl-, ethyl-, butyl-, propyl-), kde v součtu jednotlivých koncentrací butyl- a propyl- nesmí přesáhnout 0,14 % (EC, 2014; EC, 2009).

V posledních letech vykazuje celosvětová spotřeba kosmetických produktů rostoucí trend. Rozumná aplikace kosmetiky obsahující parabeny by neměla představovat riziko pro lidské zdraví, nicméně používání nepřiměřeného množství kosmetických přípravků obsahujících tyto složky může vést k rozvoji nepříznivých zdravotních účinků (Matwiejczuk *et al.*, 2020). Existují spory ohledně bezpečnosti parabenů pro spotřebitele, kde je kosmetika hlavním zdrojem těchto sloučenin, zejména s ohledem na bezoplachové kosmetické přípravky aplikované na povrch kůže, bez omezení množství a plochy aplikace. Spotřebitelé by mohli být potenciálně ohroženi pravidelným nadměrným používáním kosmetiky obsahující parabeny (Darbre *et al.*, 2004). Obecně platí, že parabeny jsou schopny pronikat přes stratum corneum, hromadit se a metabolizovat (Andersen, 2008). Rozsah penetrace závisí více na vlastnostech parabenu (rozpuštěnost, lipofilita), než na složení formulace např.

přítomnost látek zvyšujících penetraci, jako je etanol, močovina nebo propylenglykol (Pedersen, *et al.*, 2007, Matwiejczuk *et al.*, 2020). Studie *in vitro* na komerčních krémech obsahujících parabeny odhalila, že po 8 hodinách aplikace na kůži králíčího ucha propenetruje skrze modelovou bariéru až 60 % methyl-, 40 % ethyl- a 20 % propyl- parabenu (Pedersen *et al.*, 2007). Proces vstřebávání však závisí na řadě fyzikálních a biologických faktorů, jako je věk, stav kůže, teplota kůže, oblast aplikace, době kontaktu, frekvenci aplikace, hydrataci pokožky a periferním oběhu (Lopes *et al.*, 2015; Hougeir & Kircik, 2012).

## 4.2 Zdravotnické prostředky

Aby nedocházelo k sensibilizaci kůže zdravotnickými prostředky, musí být před uvedením na trh tyto vzorky testovány v souladu s ISO EN 10993-10. Tato norma se převážně týká testu *in vivo*, ale nevylučuje použití metod *in vitro*, které byly dostatečně technicky a vědecky ověřeny (ISO, 2021a). V roce 2017 prevalence vzniku alergické kontaktní dermatitidy (ACD) byla zaznamenána u 20 % populace (Alinaghi *et al.*, 2019). Toto zjištění zdůrazňuje význam koncového bodu ve strategiích toxikologického hodnocení rizik pro spotřební zboží, kosmetiku a zdravotnické prostředky. V posledních letech jsou zaznamenány případy imunitních reakcí na kovové implantáty tvořené sloučeninami niklu, kobaltu či chromu (Haddad *et al.*, 2019), dále pak ACD způsobená zdravotnickými prostředky přicházejícími do kontaktu s pokožkou, které obsahují akryláty, např. glukózové senzory či inzulínové pumpy (Herman *et al.*, 2018; Uter *et al.*, 2020). Z důvodu minimalizace tohoto rizika je sensibilizace kůže jedním ze tří testů biokompatibility, které jsou vyžadovány pro všechny zdravotnické prostředky popsané v normě ISO EN 10993, společně s kožní iritací a cytotoxicitou (ISO, 2018).

V rámci této studie bylo metodou kožní sensibilizace *in vitro* testováno 41 komerčně dostupných zdravotnických prostředků (Tab. 5). Vzorky byly extrahovány ve vhodných rozpouštědlech (D-MEM, DMSO), aby byly odhaleny všechny extrahovatelné složky pro testování pomocí poměru povrch/objem podle ISO EN 10993-12 (ISO, 2021b). Doporučený poměr 3 cm<sup>2</sup>/ml byl aplikován na pevné vzorky s definovaným povrchem o tloušťce větší než 0,5 mm. Vzorky tenčí než 0,5 mm byly extrahovány v poměru 6 cm<sup>2</sup>/ml a vzorky s nedefinovaným povrchem byly extrahovány v poměru 0,2 g/ml. Doba extrakce 24 hodin, 37 °C, byla zvolena na základě podkladů pro testování cytotoxicity tkáňových kultur v normě

ISO 10993-5. Před samotným testováním byly extrakty přefiltrovány přes 0,2 µm filtr (Whatman TM6753-2502), aby se minimalizovalo riziko biologické kontaminace, která by mohla ovlivnit výsledky.

Tab. 5: Seznam zdravotnických prostředků a výsledky testování jejich extraktů

Vzorek	Popis	LuSens	
		DMSO	D-MEM
1	Silikonový těsnicí kroužek	-	-
2	Tubus	-	-
3	Antimikrobiální Sol SB15	+	+
4	Hemostatická kolagenní hubka	-	*
5	Hemostatická kolagenní hubka	-	*
6	Hemostatický absorpční materiál	-	*
7	Krytí pro akutní a chronické rány	-	*
8	Výplň zdravotnického materiálu	+	-
9	Textil	-	-
10	Textil	-	-
11	Dvouvrstvý laminát	-	-
12	Gáza	-	-
13	Výplň zdravotnického materiálu	-	-
14	Dřevěný aplikátor	-	-
15	Vyšetřovací latexové rukavice	+	+
16	Porodní vložky	-	-
17	Absorpční podložky	-	-
18	Pěna pro velmi suchou pokožku	-	*
19	Ušní kapky	-	*
20	Nosní sprej	+	+
21	Anestetické jehly	-	x
22	Epidurální katetry	-	x
23	Ušní sprej	+	+

24	Nosní sprej	+	+
25	Aniball světle růžová	-	-
26	Bioaktivní krytí ran	-	*
27	Aniball tmavě růžová	-	-
28	Aniball lososově růžová	-	-
29	Dentální kompozit	+	-
30	Lubrikační gel třešeň	-	-
31	Hydrogel na popáleniny	-	*
32	Lubrikační gel jahoda	-	-
33	Lubrikační gel přírodní	-	-
34	Gumový materiál pro zdravotnické prostředky	+	+
35	Obvazový materiál s polštářkem	-	-
36	Punčocha po stehna	-	-
37	Pletený kolenní návlek se silikonem stabilizovanou patelou	-	-
38	Hemostatický obvaz	-	-
39	Močový katetr	-	-
40	Třívrstvý sendvičový textilní materiál	-	-
41	Třívrstvý sendvičový textilní materiál	-	*

Výsledky jsou rozděleny do 5 kategorií: - negativní výsledek, + pozitivní výsledek, +? nejednoznačný výsledek, x vzorky, které nemohly být testovány (kvůli nedostatku zkušebnímu materiálu), a \* vzorky, které nemohly být testovány (nevhodné pro metodu nebo extrakční vehikulum).

Z celkového počtu 41 vzorků bylo 33 klasifikováno jako negativní, 6 vzorků jako pozitivní (vzorky 3, 15, 20, 23, 24, 34) a dva vzorky byly pozitivní pouze v jednom z extrakčních vehikul (vzorky 8, 29). Devět vzorků bylo nevhodných pro extrakci v D-MEM (\*). Vzorky nevhodné pro extrakci v D-MEM byly cytotoxické ve všech testovaných koncentracích (vzorek 42), nebo obsahovaly kolagen (vzorky 4, 5, 6, 7 a 26), který vytvořil po aplikaci extraktů rosolovitou hmotu na povrchu buněk. Tato silná vrstva, kterou nebylo možné z buněčného povrchu odstranit, znemožnila následnou analýzu a hodnocení. Ostatní

vzorky nevhodné pro extrakci v D-MEM (vzorky 18, 19 a 31) byly ve formě pěny, která znemožňovala homogenní extrakci. Nedostatek materiálu umožnil testování 2 vzorků pouze v jednom z extrakčních vehikul - DMSO (vzorky 21 a 22).

U vzorku číslo 8 technologický postup výroby zahrnoval intenzivní mytí saponáty, které pravděpodobně nebyly účinně opláchnuty a v extraktu mohly být přítomny neznámé nečistoty z recyklace plastů. Zbytkové detergenty a nečistoty pravděpodobně způsobily pozitivní odezvu v testu LuSens (DMSO). Nově dodaná šarže tohoto materiálu (vzorek 13), vyrobená za modifikovaných podmínek včetně důkladného oplachu, poskytla negativní výsledek. Vzorek lubrikačního gelu třešeň (vzorek 30) obsahoval třešňové aroma, které bylo syntetické, nikoli přírodní potravinářské aroma a mohlo být důvodem sensibilizačního potenciálu tohoto vzorku. Další testované vzorky od stejného výrobce, lubrikační gel jahoda a přírodní lubrikační gel (vzorek 32 a 33), s velmi podobným složením kromě výše zmíněného aromatu, nevykazovaly sensibilizační potenciál. Vzorky 20, 23 a 24 vykazovaly pozitivní reakci v rámci *in vitro* testu, a to díky vyšší citlivosti metody na rostlinné extrakty, esenciální oleje a parfémy, které představují komplexní směsi a mohou zahrnovat přirozeně se vyskytující kontaktní sensibilizátory. Spektrum hlášených kožních reakcí na esenciální oleje zahrnuje kontaktní kopřivku, kontaktní dermatitidu, fototoxické reakce a také alergickou kontaktní dermatitidu (Bleasel *et al.*, 2002; Lalko & Api, 2006). Tyto sloučeniny mohou být zdrojem problémů, jsou-li obsaženy ve složení zdravotnických prostředků. Metody *in vitro* jsou také citlivější na některé typy materiálů, jako je latex, pryž nebo silikon, jak je patrné z pozitivních výsledků u vzorků 15 a 34. Často se uvádí, že latex z přírodního kaučuku způsobuje sensibilizaci nebo alergii, což vede k vážným zdravotním pracovním problémům. První zprávy o alergii na latex z přírodního kaučuku zahrnovaly pouze kontaktní dermatitidu, ačkoli později byly s rostoucí frekvencí popsány i anafylaktické reakce (Valks *et al.*, 2004). Nová forma přírodního kaučuku (guayule) je již komerčně dostupná, a používá se k výrobě latexových prostředků ve zdravotnictví, např. lékařských vyšetřovacích rukavic či katetrů. Guayule obsahuje terpenovou pryskyřici obsahující stovky isoprenoidních sloučenin. Ve studii Cornish *et al.* (2010) se uvádí, že deriváty guayule (guayuliny) jsou kontaktními sensibilizátory u morčat, ačkoli u myši nebyl zaznamenán sensibilizační potenciál nebo podráždění guayulinem A, ale pryskyřice guayule podráždila kůži myši v koncentracích okolo 10 % a vyšších, ovšem bez potvrzení sensibilizace. U lidí alergických na latex nebyla zatím také zaznamenána žádná reakce na guayulin (Cornish *et al.*, 2010).

#### 4.2.1 Diskuze

V rámci mé práce byla validovaná metoda LuSens (OECD TG 442D) navržena tak, aby ověřila schopnost detekovat kožní sensibilizátory v nízkých koncentracích, což by ji učinilo vhodnou alternativou pro testování kožní sensibilizace extraktů zdravotnických prostředků k metodě LLNA.

Zdravotnické prostředky běžně obsahují směs materiálů v nízkých koncentracích, z tohoto důvodu představují složitější testování ve srovnání s farmaceutickými nebo chemickými látkami, které lze připravit jako roztok testované látky o definované koncentraci (Myers *et al.*, 2017). Zdravotnické prostředky je často nutné před samotným testováním extrahovat pomocí polárních a nepolárních rozpouštědel podle ISO 10993-12 (ISO, 2021b). Možné sensibilizátory extrahované ze zdravotnických prostředků jsou tedy často extrémně zředěné a jejich sensibilizační potenciál může být ovlivněn jinými složkami přítomnými v extraktu. Alternativní metody pro hodnocení kožní sensibilizace byly validovány zatím pouze pro chemické látky, avšak zkoumá se jejich potenciál k predikci kožní sensibilizace u směsí a extraktů. Nové studie zahrnují optimalizaci pro testování botanických extraktů a přísad (Gan *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2017; Nishijo *et al.*, 2019), směsí a extraktů finálních produktů (Settivari *et al.*, 2015; de Ávila *et al.*, 2019; Cottrez *et al.*, 2020). Příkladem může být studie Andres *et al.* (2013), ve které se zabývali kožní sensibilizací vyvolanou rostlinnými extrakty, kde v použitém testu KeratinoSens™ (OECD TG 442D) byly tyto rostlinné extrakty hodnoceny jako negativní, avšak při obohacení známými sensibilizátory dosahovaly pozitivních hodnot. Studie poskytla důkaz o vhodnosti použité metody pro testování kožní sensibilizace *in vitro*. Též byly ověřeny schopnosti metod *in vitro* detekovat minoritní složky se sensibilizačním potenciálem.

Metoda LuSens prokázala dobrou predikční schopnost ve srovnání s *in vivo* přístupem v případě nesensibilizujících materiálů. Nicméně metoda LuSens není vhodná pro testování všech typů materiálů zdravotnických prostředků (např. vzorků ve formě pěny nebo obsahujících kolagen). Byla též prokázána vyšší citlivost *in vitro* metody na některé materiály (latex, pryž, silikon, rostlinné extrakty, éterické oleje a parfémy).

Podle výrobců zdravotnických prostředků poskytuje většina testů sensibilizace *in vivo* negativní výsledky (Myers *et al.*, 2017) a k prokázání sensibilizačního potenciálu se používá stále velké množství experimentálních zvířat. Alternativní metody založené na buňkách a

tkáních lidského původu s vyšší relevancí pro klinickou praxi dosahují prokazatelné přesnosti pro stanovení nepřítomnosti sensibilizačního potenciálu (Myers *et al.*, 2017; Bergal *et al.*, 2020) a jsou schopné predikovat bezpečnost zdravotnických prostředků přicházejících do kontaktu s lidským tělem.

### **4.3 Předměty běžného užívání – spotřební výrobky**

#### **4.3.1 Erotické pomůcky**

Existují dvě hlavní kategorie, kterými jsou erotické pomůcky obvykle v EU označeny, a to jako zdravotnické prostředky, nebo spotřební produkty. Pro označení zdravotnických prostředků musí projít výrobky přísnými kritérii a musí být prokázány zdravotní výhody. Příkladem erotických pomůcek, klasifikovaných jako zdravotnické prostředky přicházející do kontaktu se sliznicemi v lidském těle, jsou Venušiny kuličky (Kegelovy kuličky), které představují dvě spojené koule o průměru 2,5–3,5 cm. Vložením do pochvy pomáhají v posílení svalů pánevního dna, které může na jedné straně zvýšit sexuální potěšení, ale také pomáhá při problémech s ovládním močového měchýře a dalšími zdravotními problémy. Jejich používání se doporučuje ženám po porodu, gynekologické operaci či starším ženám trpícím inkontinencí (Tichotová, 2018). Podle některých odborníků až polovina starších žen v současnosti trpí malým únikem moči a třetina těchto poruch se objevuje už ve středním věku. Tzv. stresovou inkontinencí lehčího stupně lze léčit relativně efektivně speciálními cviky na posílení svalů pánevního dna a právě Venušiny kuličky mohou být užitečnou terapeutickou pomůckou (Glavind, 2001; Rubin *et al.*, 2019).

V rámci pilotní studie byly hodnoceny možné nepříznivé zdravotní účinky 20 erotických pomůcek, zakoupených na českém trhu. Extrakty byly připraveny podle normy ISO EN 10993-12 v D-MEM. Jelikož výrobci často neposkytnou úplné informace o složení konečného výrobku na obalu, produkty byly podrobeny infračervené spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) za účelem ověření deklarovaných druhů plastových materiálů pomocí přístroje IR AVATAR 320 FT-IR (BRUKER). Zařízení umožňuje měřit hlavní součást vzorku, ale nelze vyloučit výskyt měkčených materiálů v podobě přísad, které byly pod detekčním limitem. Výběr byl zaměřen na erotické pomůcky s lékařským využitím (Kegelovy kuličky/ Venušiny kuličky) a další produkty jakou jsou vibrátory, dilda nebo umělá vagina (Tab. 6).

Tab. 6: Seznam testovaných vzorků erotických pomůcek včetně porovnání materiálového složení stanoveného v laboratoři s deklarovaným na obalu a výsledků zkoušky sensibilizace extraktů metodou LuSens

Vzorek č.	Země původu	Materiál	Materiál deklarovaný výrobcem	Extrakt v D-MEM
1.	Čína	čistý 100% silikon	čistý 100% silikon	-
2.	Čína	čistý 100% silikon	čistý 100% silikon	-
3.	Čína	čistý 100% silikon	čistý 100% silikon	+
4.	Čína	čistý 100% silikon	čistý 100% silikon	+
5.	Čína	čistý 100% silikon, ABS	čistý 100% silikon, ABS	+
6.	Čína	čistý 100% silikon	čistý 100% silikon	+
7.	Čína	termoplastická guma	termoplastická guma	-
8.	Čína	styrenový termoplastický elastomer	styrenový termoplastický elastomer	*/-
9.	Čína	ABS	ABS	*/-
10.	Čína	polyethylene terephthalate, ABS	polyethylene terephthalate, ABS	*/-
11.	Polsko	polyisopren/ latex	latex	*/-
12.	Německo	PVC	PVC	+
13.	Polsko	100% latex	100% latex	*/+
14.	Čína	PVC (Jelly)	PVC (Jelly)	+
15.	Čína	silikon	termoplastická guma	-
16.	Čína	PVC (želé)	PVC (želé)	+
17.	Čína	ABS	ABS	+
18.	Čína	PVC	PVC	+
19.	Čína	PVC	latex	-
20.	Čína	ABS	PVC bez ftalátů	+

Výsledky jsou rozděleny do 3 kategorií: - negativní výsledek, + pozitivní výsledek a \* vzorky, které vykazovaly ve 100% extraktu viabilitu <70 %, což je známkou cytotoxického efektu.

V testu LuSens vykazovaly vzorky 3, 4, 5, 6, 12, 14, 16, 17, 18 a 20 indukci luciferázové aktivity vyšší než 1,5násobek a jejich životaschopnost byla vyšší než 70 %, což značí potenciál sensibilizace kůže. Neřaděné extrakty (100%) vzorků 8, 9 a 10 (vyrobené z elastomeru na bázi styrenu) a vzorků 11 a 13 (vyrobené z latexu) vykazovaly životaschopnost mnohem menší než 70 %, což je známkou cytotoxického efektu. V 75% extraktu (vzorky 8, 9, 10) a v 1% extraktu (vzorky 11 a 13) již prokázaly životaschopnost  $\geq$  70 %, a současně nebyl prokázán senzibilizační potenciál. Pouze u vzorku 13 byly



zaznamenány hraniční hodnoty pro kožní sensibilizaci. Zvýšená životaschopnost zaznamenaná u dvou vzorků (16 a 20) byla pravděpodobně způsobena extrahovanými barvivy interferujícími s testem MTT, jelikož mikroskopické hodnocení buněčné kultury neodhalilo významný nárůst oproti kontrole extrakčního činidla.

#### 4.3.2 Diskuze

Extrakty finálních produktů představují směsi neznámých látek. Pro účely posouzení rizik je důležité identifikovat potenciální toxicitu simulací podmínek *in vivo*. Výsledky metod *in vitro* slouží jako orientační data s přidanou hodnotou pro screening potenciálních interakcí na molekulární a buněčné úrovni, s potenciální predikcí nepříznivých účinků na vyšší biologické úrovni.

Citlivé metody *in vitro* stále častěji prokazují své možné využití pro hodnocení bezpečnosti, a jak naznačují i naše výsledky, nejvíce ceněným přínosem metod *in vitro* je předpověď bezpečnosti pro „*in vitro* bezpečné“ spotřebitelské produkty (tj. produkty, které nevykazují biologické účinky na buněčné úrovni) Naše výsledky potvrdily sensibilizační potenciál u výrobků z PVC a latexu. Je známo, že latex může způsobit sensibilizaci nebo alergickou reakci, která vede k vážným zdravotním problémům. PVC je tuhý polymer a pro zlepšení jeho vlastností se mísí se změkčovadly (plastifikátory). Nejběžnější změkčovadla používaná v průmyslovém měřítku jsou ftaláty, jejichž toxikologická rizika, především v případě DTDP a TINTM, byla opakovaně prokázána (Carlson a Patton, 2010; ECHA, 2020). Jelly je forma měkčeného PVC, kde obsah ftalátů může být až 70%, to znamená, že více než 2/3 materiálu mohou obsahovat plastifikátory (Nilsson et al., 2006).

V současné době prakticky neexistují žádné bezpečnostní normy, které by regulovaly chemikálie používané pro výrobu erotických pomůcek. Výrobci mohou své produkty vyrábět volně z jakéhokoli materiálu, včetně nejběžnějších ftalátů. Většina erotických pomůcek se vyrábí v Číně, a to zcela bez nebo jen s minimálním popisem materiálu, z kterého jsou vyrobeny. Bohužel výrobci často neposkytují úplné informace o složení konečného produktu na obalu, a často se lze také setkat s nepravdivými tvrzeními jako „100% silikon“ popř. „bez ftalátů“. V EU musí být na obalu výrobku všechna označení, varování a návod k použití (EP, 2002). Nařízení Evropského parlamentu a Rady EU č. 1907/2006 týkající se REACH (EC, 2006) se vztahuje na všechny chemikálie včetně složek spotřebního zboží. Ftaláty nejsou jediné potenciálně nebezpečné chemikálie nacházející se

v erotických pomůckách. Komplexní popis chemického složení výrobku, včetně antimikrobiálních a dalších přísad (např. stříbro, triclosan, měď, oxid zinečnatý, barviva, vůně atd.), je zahrnut jen zřídka na balení produktu.

V roce 2006 Dánský technologický institut testoval 16 náhodně vybraných erotických pomůcek. Bylo odhaleno několik nebezpečných látek, včetně ftalátů (DEHP, DNOP a DINP), kadmia, cínu, trimethylcínchloridu a fenolů. „Jelly“ je široce používané materiálové označení pro „želé“ formu PVC. Obsah ftalátů v PVC může být až 70 %, což znamená, že více než 2/3 materiálu mohou obsahovat plastifikátory (Nilsson *et al.*, 2006). V průběhu roku 2016 Švédská agentura pro chemické látky (KEMI, 2017) provedla dozor nad obsahem chemických látek v erotických pomůckách prodávaných na švédském trhu. Kontrolováno bylo 44 výrobků od 16 výrobců, zejména výrobky z měkčeného PVC a elektrická zařízení. Jeden z kontrolovaných produktů, dildo z měkčeného PVC, obsahovalo zakázané hladiny chlorovaných parafínů, které jsou nebezpečné pro životní prostředí a rovněž podezřelé z karcinogenity. Další tři erotické pomůcky obsahovaly ftalát DEHP v koncentracích nad 0,1 % hmotnosti. DEHP a další ftaláty (DBP, BBP, DIBP) jsou omezeny limitem v EU od července 2020 (EC, 2018).

Informace o nepříznivých účincích způsobených erotickými pomůckami jsou velmi vzácné. Navzdory klesajícímu tabu kolem erotických pomůcek stále existuje hodně studu, když přijde řeč na jejich použití. Hlášené nežádoucí zdravotní účinky zahrnují především příznaky zánětu, kontaktní dermatitidy nebo podráždění (Keenan, 2014; Sloan, 2017).

Podle nařízení 2017/745 o zdravotnických prostředcích splňují erotické pomůcky parametry zdravotnických prostředků I. třídy (tj. neinvazivní zařízení, která přicházejí do kontaktu s poraněnou kůží popřípadě sliznicemi). Toto nařízení přináší přísnější normy pro výrobce, nicméně pro třídu I. zdravotnických prostředků nejsou klinické zkoušky povinné (EU, 2017b). Všechny zdravotnické prostředky musí splňovat požadavky norem řady ISO 10993 týkající se biokompatibility, což vyžaduje chemickou charakterizaci toxikologické hodnocení biologických účinků a rizik, kterému se výrobci erotických pomůcek snaží vyhnout. Analýza rizika a přínosu u zdravotnických prostředků se staví nad chemickou bezpečnost. Pro ochranu spotřebitele je třeba hledat kvalitní a bezpečné neporézní materiály, návody pro bezpečné použití a údržbu. Pravdou však zůstává, že většina erotických pomůcek se na trhu prodává jako spotřební zboží. Například v České republice v databázi

zdravotnických prostředků regulované Ministerstvem zdravotnictví jsou uvedeny pouze tři produkty (Kegelovy kuličky) pod označením zdravotnický prostředek (<https://eregpublicsecure.ksrzis.cz/Registr/RZPRO/ZdravotnickyProstredek/Detail/55812>).

Důležité je apelování na vládní orgány, aby regulovaly průmysl erotických pomůcek a vyžadovaly jejich testování bezpečnosti. Nejrealističtější prvním krokem k řešení problému je zvýšení povědomí veřejnosti o rizicích, která souvisí s používáním těchto produktů, vzhledem k proměnlivé kvalitě produktů na trhu. Snadná dostupnost na internetu ztěžuje ověření kvality produktů, navíc místní distributoři a výrobci nemohou soutěžit s cenami nabízenými online, což vede u většiny vyráběných produktů k omezené nebo žádné regulaci materiálů. V roce 2018 provedla OECD celosvětovou osvětovou kampaň ke zvýšení povědomí o bezpečnosti produktů prodávaných online, kdy podle statistik bylo až 68 % spotřebitelských výrobků dodávaných online zakázáno nebo staženo z trhu (OECD, 2018c).

Je zřejmé, že erotické pomůcky představují sortiment šedé zóny tam, kde neexistují žádné konkrétní pokyny, a je proto vysoce potřebné provádět kontroly k zajištění bezpečnosti veřejného zdraví.

#### **4.4 Funkcionalizace ochranných oděvů aplikací finálních úprav prádelenskými postupy**

Funkcionalizace oděvů by měla zaručit dosažení vyšší přidané hodnoty dodáním bariérových efektů pracovním oděvům, lůžkovinám, apod. (nehořlavost, snížená špinivost, antimikrobiální vlastnosti). Reaktivace (obnovení) dodaných efektů po určeném počtu cyklů údržby by měla vést k podstatnému prodloužení životnosti oděvů, které by jinak musely být pro daný účel nahrazeny novými. V případě nešpinivých (tzv. soil release) úprav by mělo dojít navíc k významnému snížení poškození oděvů z průmyslových, potravinářských provozů a gastronomického sektoru, vzhledem k nižšímu znečištění barevnými a mastnými skvrnami by mělo být možno prát oděvy v mírnějších režimech, tj. při nižších teplotách, bez použití agresivních chemikálií. Bude tak možné zkrácení pracího cyklu, a tím i k úspoře vody, energie, snížení množství odpadních vod. Dalším faktorem vedoucím k podstatnému prodloužení životnosti oděvů by měla být náhrada bavlněných konstrukcí směsnými materiály bavlna/polyester za využití výhodných vlastností obou druhů vláken: celulózová složka by měla zajistit fyziologický komfort nošení a polyesterový podíl by měl zajistit vyšší pevnost, odolnost a rychlejší odvádění potu. Prodloužení životnosti textilií reaktivací

funkčních úprav, mírnějšími režimy údržby, a vyšším uplatněním směsných konstrukcí by mělo vést v podmínkách leasingové prádelny k významným úsporám v nákladech na vlastní zboží vzhledem k dematerializaci (nižší množství oděvů s vysokou přidanou hodnotou a s delší životností) i v nákladech na prádelenskou údržbu. Pro leasingovou prádelnu by to znamenalo možnost prádelenské recyklace funkčních úprav vedle zásadní úspory materiálu a energie a také významné zvýšení konkurenceschopnosti v důsledku prodloužení životnosti nabízených funkčních výrobků.

V laboratoři SZÚ byl hodnocen potenciál sensibilizace u vzorků z provozně aplikovaných antimikrobiálních úprav provedených v Prádelně LOTOS: Materiály 50/50 PES/Cel, 90/10 Ba/Ly a 75/25 PES/Ba z provozní zkoušky Prádelny LOTOS – úprava ULTRA-FRESH KW-48 s následnou hydrofobní úpravou BAYGARD BCS-01 (Tab. 7), hodnoceny byla také vzorky po praní v 25 cyklech při 40°C.

Zkouška LuSens byla provedena na extraktech materiálů připravených v DMSO (plocha 3 cm<sup>2</sup>/ ml extrakčního činidla, extrakční čas 24 hod při 37°C).

Tab. 7: Charakterizace vzorků (složení a úpravy) a výsledky hodnocení sensibilizace jejich extraktů metodou LuSens

Č.	Ozn.	Složení	Úprava (dvoustupňová)	LuSens (extrakt v DMSO)
1.	1A	(A) 50 % polyester/50 % celulóza (viskóza) kepr - růžová	1. AMB+TEXAFIX V, (mezi)fixace	-
2.	1A praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS-01/TP fixace	-
3.	2A		1. AMB+TEXAFIX V, (mezi)sušení	-
4.	2A praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS-01/TP fixace	-
5.	3A		1. AMB+ACRAMIN BSN, (mezi)fixace	-
6.	3A praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS-01/TP fixace	-
7.	4A			-

8.	4A praní 25x40°		1. AMB+ACRAMIN BSN, (mezi)sušení 2. HOF Baygard BCS- 01/TP fixace	-
9.	A bez úpravy		Bez úpravy	-
10.	1B	(B) 90 % bavlna/10 % lycra úplet - bílá	1. AMB+TEXAFIX V, (mezi)fixace	-
11.	1B praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS- 01/TP fixace	+
12.	2B		1. AMB+TEXAFIX V, (mezi)sušení	-
13.	2B praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS- 01/TP fixace	-
14.	3B		1. AMB+ACRAMIN BSN, (mezi)fixace	-
15.	3B praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS- 01/TP fixace	-
16.	4B		1. AMB+ACRAMIN BSN, (mezi)sušení	-
17.	4B praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS- 01/TP fixace	+
18.	B bez úpravy		Bez úpravy	-
19.	1C	(C) 75 % polyester/25 % bavlna kepr	1. AMB+TEXAFIX V, (mezi)fixace	+
20.	1C praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS- 01/TP fixace	-
21.	2C		1. AMB+TEXAFIX V, (mezi)sušení	-
22.	2C praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS- 01/TP fixace	-
23.	3C		1. AMB+ACRAMIN BSN, (mezi)fixace	-
24.	3C praní 25x40°			-

			2. HOF Baygard BCS-01/TP fixace	
25.	4C		1. AMB+ACRAMIN BSN, (mezi)sušení	+
26.	4C praní 25x40°		2. HOF Baygard BCS-01/TP fixace	-
27.	C bez úpravy		Bez úpravy	-

Výsledky jsou rozděleny do 2 kategorií: - negativní výsledek, + pozitivní výsledek. Vzorky byly připraveny jako výseče o ploše 3 cm<sup>2</sup> na 1 ml extrakčního činidla (DMSO). Extrakty byly dále ředěny v D-MEM s obsahem 1 % séra (FBS) a testovány v 6 koncentracích.

Na základě dvou opakování testu bylo prokázáno, že prané vzorky 11 a 17 (materiálu B: 90 % bavlna/10 % lycra úplet - bílá) vykazují sensibilizující potenciál, který dosahoval hodnot indukce luciferázové aktivity  $\geq 1,5$ násobek indukce luciferázové aktivity a současně neprané vzorky 19 a 25 (materiálu C: 75 % polyester/25 % bavlna kepr) poskytly rovněž pozitivní odpověď.

#### 4.4.1 Diskuze

V rámci toxikologického posouzení sensibilizace kůže byly ověřeny 3 typy materiálů (A, B, C) s aplikací různých úprav a prádelenských procesů (praní 25x40°). U materiálu 1B s aplikací vrstev (AMB+TEXAFIX V s mezifixací a HOF Baygard BCS-01/TP s fixací) a materiálu 4B (AMB+ACRAMIN BSN s mezisúšením a HOF Baygard BCS-01/TP s fixací) došlo v důsledku 25 cyklů praní při 40° ke zhoršení toxikologických vlastností materiálů, oproti neošetřenému materiálu, z hlediska sensibilizace kůže. Naopak v případě materiálu 1C s vrstvami (AMB+TEXAFIX V s mezifixací a HOF Baygard BCS-01/TP s fixací) a materiálu 4C s vrstvami (AMB+ACRAMIN BSN s mezisúšením a HOF Baygard BCS-01/TP s fixací) byl prokázán horší toxikologický profil u základních materiálů než při aplikaci 25 cyklů praní při 40°, kdy došlo ke zlepšení toxikologických vlastností z hlediska sensibilizace kůže.

V průběhu této etapy grantového projektu byly práce zaměřeny na optimalizaci funkčních úprav aplikovaných prádelenským postupem a jejich provozní ověření. Laboratorní zkoušky byly provedeny v INOTEXU, poloprovozní a provozní zkoušky pak

paralelně probíhaly na technologickém zařízení v INOTEXU a na provozním zařízení Prádelny LOTOS s cílem stanovení směrných technologií nehořlavých, hydrofobních/oleofobních a antimikrobiálních úprav na materiálech/oděvech ze sortimentu Prádelny LOTOS včetně režimů reaktivace efektů. Hodnocení dosažených efektů, mechanicko-fyzikálních a fyziologických vlastností bylo dle odpovídajících standardů prováděno ve zkušebně INOTEXU, testování antimikrobiálních vlastností, testování cytotoxicity a kožní snášenlivosti těchto upravených textilií proběhlo ve specializovaných laboratořích Státního zdravotního ústavu se sídlem v Praze (SZÚ).

## 5 Závěr

Požadavek toxikologie 21. století je nahradit experimenty na laboratorních zvířatech pomocí *in vitro* modelů s využitím lidských buněk a tkání, které jsou reprodukovatelnější, rychlejší, cenově efektivnější a především vykazují vyšší relevanci k expozici člověka. Expozice vysoké dávce jedné látky u krátkověkého zvířete o hmotnosti několika set gramů nemá takovou vypovídající hodnotu, co se týče rizik pro člověka. Rozhodně neodráží lidskou rozmanitost, jako je věk, pohlaví, hmotnost nebo rasa. Důležité je také, že nejsme vystaveni jednotlivým chemikáliím, ale jejich směsím ve velmi odlišných koncentracích. Z tohoto důvodu vznikla snaha nahradit pokusy na zvířatech alternativními metodami, které v oblasti testování toxicity stále častěji nahrazují zvířecí modely. Získaná data se používají pro rozhodování o veřejném zdraví a k ochraně životního prostředí. Ovšem pouze metody, které splňují legislativní požadavky (např. legislativa EU REACH), jsou přijímány jako oficiální testovací nástroje a vzhledem ke globalizaci trhů jsou uznávány na mezinárodní úrovni (např. začleněním do zkušebních pokynů OECD). Validace alternativních metod se provádí prostřednictvím vědeckých studií hodnotících dvě klíčové hypotézy, spolehlivost a relevanci zkušební metody pro zamýšlený účel.

Tato práce byla zaměřena na zavedení metody OECD TG 442D (LuSens), jako jedné ze tří dosud validovaných *in vitro* metod postihujících dílčí kroky dráhy AOP pro sensibilizaci kůže, k hodnocení potenciálu kožní sensibilizace.

Na základě stanovených cílů práce, které spadaly pod grantové projekty, byla hodnocena bezpečnost zdravotnických prostředků, spotřebních výrobků, kosmetických přípravků, ingrediencí, přísad a konzervantů. Dále také toxikologické hodnocení bezpečnosti nově vyvíjených materiálů v rámci projektu Funkcionalizace ochranných oděvů aplikaci finálních úprav prádelenskými postupy a prodloužením životnosti oděvů reaktivací efektů v rámci prádelenského servisu.

Experimentální práce byla zaměřena na řešení problematiky přípravy extraktů zdravotnických prostředků a spotřebních výrobků. Studie s využitím buněčné linie lidských keratinocytů (LuSens) odhalila, že může být mnohem užitečnější pro predikci hazardu kožní sensibilizace u člověka než konvenční zkouška s využitím lokálních lymfatických uzlin myši (LLNA). Z hlediska welfare zvířat je LLNA nepochybně vhodnější metodou ve srovnání s konvenčními toxikologickými metodami *in vivo*, kdy jsou zvířata vystavena méně



bolestivým a stresujícím situacím, než např. v maximalizačním testu na morčatech (Basketter *et al.*, 2005; Hoffmann, 2015). Vysoká variabilita výsledků na zvířatech je však ukazatelem nejistoty, pokud jde o koncový bod LLNA (EPA, 2018). V rámci dílčí práce zaměřené na zdravotnické prostředky byla zaznamenána shoda výsledků mezi zkouškou na zvířatech a metodou LuSens 80 % v případě extraktů připravených v D-MEM a 85,4 % u extraktů připravených v DMSO. Tyto výsledky přispěly k prokázání vhodnosti a použitelnosti *in vitro* metod pro testování extraktů zdravotnických prostředků, především v případě vzorků bez potenciálu sensibilizace. Bylo ovšem prokázáno, že ne všechny typy materiálů zdravotnických prostředků jsou vhodné pro testování touto metodou. Metoda LuSens je citlivější k některým typům materiálů, jako je např. latex, guma, silikon, či rostlinným extraktům a esenciálním olejům, které jsou často součástí zdravotnických prostředků. V současné době je tato metoda již zavedena pro Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti Státního zdravotního ústavu (SZÚ) v Praze, a nabízena jako jedna z alternativních metod pro testování kožní sensibilizace.

Další část experimentální práce zahrnovala hodnocení sensibilizace kůže u kosmetických prostředků, přísad, ingrediencí a konzervantů. V těchto případech bylo prokázáno, že pokud látka vykazovala potenciál k sensibilizaci kůže, byla i experimentálně potvrzena její koncentrační závislost.

V neposlední řadě byla metoda LuSens zařazena k ověření bezpečnosti v rámci toxikologického hodnocení bezpečnosti nově vyvinutých materiálových úprav textilií s optimalizovanými funkčními úpravami aplikovanými pro prádelenské postupy a s důrazem na prodloužení životnosti oděvů reaktivací efektů v rámci prádelenského servisu.

Závěrem lze říci, že se jedná o robustní metodu, snadno transferovatelnou do zavedených buněčných a tkáňových laboratoří. Tato metoda poskytuje dobře reprodukovatelné výsledky na různých typech matric (směsi nebo extrakty), nejen pro chemické látky. Jedná se o validovanou metodu dráhy AOP a dle OECD No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitization je nedílnou součástí baterie testů, které by měly v blízké budoucnosti zcela nahradit zkoušky sensibilizace na zvířatech.

## 6 Seznam literatury

- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., Benthem van J., Zuang, V., Andersen K. E., Angers-Loustau, A., Aptula, A., Bal-Price, A., Benfenati, E., Bernauer, U., Bessems, J., Bois, F. Y., Boobis, A., Brandon, E., Bremer, S., Broschard, T., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Cronin, M., Daston, G., Dekant, W., Felter, S., Grignard, E., Gundert-Remy, U., Heinonen, T., Kimber, I., Kleinjans, J., Komulainen, H., Kreiling, R., Kreysa, J., Leite, S. B., Loizou, G., Maxwell, G., Mazzatorta, P., Munn, S., Pfuhrer, S., Phrakonkham, P., Piersma, A., Poth, A., Prieto, P., Repetto, G., Rogiers, V., Schoeters, G., Schwarz, M., Serafimova, R., Tähti, H., Testai, E., Delft van J., Loveren, van H., Vinken, M., Worth, A., Zaldivar J. M. (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology*, 85, 367-485. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0693-2>
- Aeby, P., Ashikaga, T., Bessou-Touya, S. Schapky, A., Geberick, F., Kern, P., Marrec-Fairley, M., Maxwell, G., Ovigne, J. M., Sakaguchi, H., Reisinger, K., Tailhardat, M., Martinozzi-Teisser, S. and Winkler, P. (2010) Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and methods development program. *Toxicology in Vitro*, 24, 1465-1473. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.005>
- Alinaghi, F., Bennike, N. H., Egeberg, A., Thyssen, T. P., Johansen, J. D. (2019) Prevalence of contact allergy in the general population: A systematic review and meta-analysis. *Contact Dermatitis*, 80(2), 77-85. <https://doi.org/10.1111/cod.13119>
- Andersen, K. E., Volund, A., Frankild, S. (1995) The guinea-pig maximization test – with a multiple-dose design. *Acta Dermato Venereologica*, 75(6), 463–469.
- Andersen, F. A. (2008) Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben and Benzylparaben as used in Cosmetic Products. *International Journal of Toxicology*, 27(4), 1-82. <https://doi.org/10.1177/109158180802704s01>.
- Andres, E., Sá-Rocha, V. M., Barrichello, C., Haupt, T., Ellis, G., Natsch, A. (2013) The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: a pilot study. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1220-1225. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.008>

- Arribas, M. P., Soro, P., Silvestre, J. F. (2012) Allergic Contact Dermatitis to Fragrances. *ACTAS Dermo-Sifiliográficas*, 130(10), 874-879. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2012.01.022>
- Aslan, K. & Geddes, C. D. (2009) Metal-enhanced chemiluminescence: advanced chemiluminescence concepts for the 21st century. *Chemical Society Reviews*, 28(9), 2556-2564. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/cs/b807498b/unauth>
- Basketter, D. A., Andersen, K. E., Liden, C., Loveren, H. V., Boman, A., Kimber, I., Alanko, K., Berggren, E. (2005) Evaluation of the skin sensitizing potency of chemicals by using the existing methods and considerations of relevance for elicitation. *Contact Dermatitis*, 52(1), 39-43. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00490.x>
- Basketter, D. A., Geberick, G. F., Kimber, I. (2007) The local lymph node assay: current position in regulatory classification of skin sensitizing chemicals. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 26(4), 293-301. <https://doi.org/10.1080/15569520701556647>
- Basketter, D. A. and Kimber, I. (2009) Updating the skin sensitisation in vitro data assessment paradigm in 2009. *Journal of Applied Toxicology*, 29, 545-550. <https://doi.org/10.1002/jat.1443>
- Basketter, D. A., Huggard, J., Kimber, I. (2019) Fragrance inhalation and adverse health effects: The question of causation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 104, 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.03.011>
- Bauch, C., Kolle, S. N., Ramirez, T., Eltze, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2012) Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(3), 489-504. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.05.013>
- Bergal, M., Puginier, M., Gerbeix, C., Groux, H., Roso, A., Cottrez, F., Milius, A. (2020) In vitro testing strategy for assessing the skin sensitizing potential of “difficult to test” cosmetic ingredients. *Toxicology in Vitro*, 65, 104781. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104781>
- Bleasel, N., Tate, B. and Rademaker, M. (2002) Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. *Australasian Journal of Dermatology*, 43(3), 211-213. <https://doi.org/10.1046/j.1440-0960.2002.00598.x>

- Bledzka, D., Gromadzińska, J., Wasowicz, W. (2014) Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International*, 67, 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.007>.
- Carlson, K. R., Patton, L. E. (2010) Toxicity Review of Ditridecyl phthalate (DTDP). <https://www.cpsc.gov/s3fs-public/ToxicityReviewOfDTDP.pdf>. (citováno 20. 1. 2022).
- Chambers, E. S. & Vukmanovic-Stejic, M. (2020) Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*, 160(2), 116-125. <https://doi.org/10.1111/imm.13152>
- Cherian, P., Zhu, J., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W. and Heldreth, B. (2020) Amended Safety Assessment of Parabens as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 39(1), 5-97. <https://doi.org/10.1177/1091581820925001>
- Christie, R. M. (2015) Phthalocyanines. In: *Colour Chemistry*, 2nd Edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 133-146. (citováno 12. 1. 2022)
- Chung, K. T. (2016) Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C, Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 34(4), 233-261. <https://doi.org/10.1080/10590501.2016.1236602>
- Clausen, B. E. and Stoitzner, P. (2015) Functional Specialization of Skin Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses. *Frontiers in Immunology*, 6, 534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00534>
- Coleman, K. P., McNamara, L. R., Grailer, T. P., Willoughby, J. A., Keller, D. J., Patel, P., Thomas, S. and Dilworth C. (2015) Evaluation of an in vitro human dermal sensitization test for use with medical device extracts. *Applied In vitro Toxicology*, 1(2), 118–130. <https://doi.org/10.1089/aivt.2015.0007>
- Cornish, K., Williams, J. L., Kirk, M. Teetor, V. H., Ray, D. T. (2010) Evaluation & control of potential sensitizing & irritating chemical components in natural rubber latex extracted from the industrial crop guayule. *Industrial Biotechnology*, 5(4), 245-252. <https://doi.org/10.1089/ind.2009.5.245>
- Cottrez, F., Boitel, E., Berrada-Gomez, M. P. Dalhuchyts, H., Bidan, C., Rattier, S., Ferret, P. J., Groux, H. (2020) In vitro measurement of skin sensitization hazard of mixtures and

- finished products: Results obtained with the SENS-IS assays. *Toxicology in Vitro*, 62, 104644. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104644>
- Coultate, T. & Blackburn, R. (2018) Food colorants: their past, present and future. *Coloration Technology*, 134(3), 165-186. <https://doi.org/10.1111/cote.12334>
- Cuesta, L. Silvestre, J. F., Toledo, F., Lucas, A., Crespo, M. P., Ballester, I. (2010) Fragrance contact allergy: a 4-year retrospective study. *Contact Dermatitis*, 63(2), 77-84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2010.01739.x>
- Daniel, A., Strickland, J., Allen, D., Casati, S., Zuang, V., Barroso, J., Whelan, M., Regimbald-Krnel, M. J., Kojima, H., Nishikawa, A., Park, H. K., Lee, J.K., Kim, T. S., Delgado, I., Rios, L., Yang, Y., Wang, G., Kleinstreuer, N. (2018) International regulatory requirements for skin sensitization testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95, 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.03.003>
- Darbre, P. D., Aljarrah, A., Miller, W. R., Coldham, N. G., Sauer, M. J., Pope, G. S. (2004) Concentrations of parabens in human breast tumors. *Journal of Applied Toxicology*, 24(1), 5-13. <https://doi.org/10.1002/jat.958>.
- Darbre, P. D., and Harvey, P. W. (2008) Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*, 28(5), 561-578. <https://doi.org/10.1002/jat.1358>
- de Ávila, R. I., Velosa, D. F. M. C., Teixeira, G. C., Rodrigues, Thaisangela, L., Lindberg, T., Lindstedt, M., Fonseca, S. G., Lima, E. M., Valadares, M. C. (2019) Evaluation of in vitro testing strategies for hazard assessment of the skin sensitization potential of real-life mixtures: The case of henna-based hair-colouring products containing p-phenylenediamine. *Contact Dermatitis*, 81, 194-209. <https://doi.org/10.1111/cod.13294>
- Downham, A. & Collins, P. (2000) Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 5-22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>
- ECHA (2020) Látky sensibilizující kůži. <https://echa.europa.eu/cs/hot-topics/skin-sensitising-chemicals> (citováno 9. 7. 2021)

Enoch, S. J., Ellison, C. M., Schultz, T. W., and Cronin, M. T. D. (2011) A Review of the Electrophilic Reaction Chemistry Involved in Covalent Protein Binding Relevant to Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(9), 783–802. <https://doi.org/10.3109/10408444.2011.598141>

EC (2003) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Official Journal of the European Union*, 66, 26-35.

EC (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union*, L 396, 1-520.

EC (2009) Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products. *Official Journal of the European Union*.

EC (2014) Commission Regulation (EU) No 358/2014 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on Cosmetic Products Text with EEA relevance. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0358&from=EN>

EC (2018) Commission Regulation (EU) 2018/2005 of 17 December 2018 amending Annexes XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP), benzyl butyl phthalate (BBP) and diisobutyl phthalate (DIBP). *Official Journal of the European Union*, L 327/14, 1-6.

ECHA (2020) Trinonyl benzene-1,2,4-tricarboxylate. <https://echa.europa.eu/cs/substance-information/-/substanceinfo/100.047.761>. (citováno 20., 1. 2022)

Elbanna, K., Sarhan, O. M., Khider, M., Elmogy, M., Abulreesh, H. H., Shaaban, M. R. (2017) Microbiological, histological, and biochemical evidence for the adverse effects of food azo dyes on rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 667–680. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.01.005>

Emter, R., Ellis, G., Natsch, A. (2010) Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 24(3), 281-290. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.03.009>

EP (2002) Directive 2001/95/EC of the European Parliament and of the Council of 3 December 2001 on general product safety. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32001L0095> (citováno 5. 1. 2022).

EPA (2018) Interim Science Policy: Use of Alternative Approaches for Skin Sensitisation as a Replacement for Laboratory Animal Testing. <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2016-0093-0090> (citováno 25. 1. 2022)

EU (2016) Commission regulation (EU) 2016/1688 of 20 September 2016 amending Annex VII to Regulation (EC) No 1970/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards skin sensitisation. *Official Journal of the European Union*, 255, 1-3.

EU (2017a) Commission regulation (EU) 2017/1410 of 2 August 2017 amending Annex II and III to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. *Official Journal of the European Union*, 202, 1-3.

EU (2017b) Regulation (EU) 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017, on medical devices, amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and repealing Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EEC. *Official Journal of the European Union*. L117/1, 1-175.

ES (2003) Directive 2003/65/EC of the European Parliament and of the Council of 22 July 2003 amending Council Directive 86/609/EEC on the approximation of the laws regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animal used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, 230, 32-33.

- Feller, L., Wood, N. H., Khammissa, R. A. G, Lemmer, J. (2017) Review: allergic contact stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 123(5), 559-565. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.02.007>
- Gan, D., Norman, K., Barnes, N., Raabe, H., Gomez, C. and Harbell, J. (2013) Application of the KeratinoSens™ Assay for Prediction of Dermal Sensitization Hazard for Botanical Cosmetic Ingredients. <https://bit.ly/3cq5IHC> (citováno 30. 11. 2021)
- Gerberick, G. F., Vassallo, J. D., Bailey, R. E., Chaney, J. G., Morrall, S. W., Lepoittevin, J. P. (2004) Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences*, 81(2), 332-343. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh213>
- Glavind, K. (2001) Conservative Treatment of Stress Incontinence with Geisha Balls. *International Urogynecology Journal*, 12(4), 223-225. <https://doi.org/10.1007/s001920170042>.
- Goldberg, M. C. & Weiner, E. R. (1989) The science of luminiscence. ACS Symposium Series, in *Luminescence Applications in biological, chemical environmental and hydrological sciences*, 383(1), 1-22.
- Golden, R., Gandy, J., & Vollmer, G. (2005) A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Critical Reviews in Toxicology*, 5, 435–458. <https://doi.org/10.1080/10408440490920104>.
- Haddad, S. F., Helm, M. M., Meath, B., Adams, C., Packianathan, N., Uhl, R. (2019) Exploring the incidence, implications, and relevance of metal allergy to Orthopaedic surgeons. *Journal of American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 3(4), 23. <https://doi:10.5435/JAAOSGlobal-D-19-00023>
- Hashem, M. M., Atta, A. H., Arbid, M. S., Nada, S. A., Asaad, G. F. (2010) Immunological studies on Amaranth, Sunset Yellow and Curcumin as food colouring agents in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1581–1586. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.028>
- Herman, A., de Montjoye, L., Tromme, I., Goossens, A., Baeck, M. (2018) Allergic contact dermatitis caused by medical devices from diabetes patients: a review. *Contact Dermatitis*, 79(6), 331-335. <https://doi.org/10.1111/cod.13120>



- Hoffman, S. (2015) LLNA Variability: An Essential Ingredient for a Comprehensive Assessment of Non-Animal Skin Sensitization Test Methods and Strategies. *ALTEX*, 32(4), 379-383. <https://doi.org/10.14573/altex.1505051>
- Hougeir, F. G. & Kircik, L. (2012) A review of delivery systems in cosmetics. *Dermatologic Therapy*, 3, 234–237. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01501.x>.
- Huppert, C., Paris, C., Langonné, I., Muller, S., Mathiot, J., Abdessadeq, H., Gagnaire, F., Battais, F., Sponne, I. (2018) Activation of T Cells by Dendritic Cells Exposed to a Reference Sensitizer: Towards a Promising Model to Assess the Allergenic Potential of Chemicals. *Contact Dermatitis*, 79, 67–75. <https://doi.org/10.1111/cod.12991>
- ISO (2018) Biological Evaluation of Medical Devices – Part 1: Evaluation and Testing Within a Risk Management Process. ISO 10993-1. <https://www.iso.org/standard/68936.html>
- ISO (2021a) ISO 10993-10:2021. Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests for skin sensitization. <https://www.iso.org/standard/75279.html>
- ISO (2021b) Biological Evaluation of Medical Devices – Part 12: Sample preparation and reference materials. ISO 10993-12. <https://www.iso.org/standard/75769.html>
- Jewell, C., Prusakiewicz, J. J., Ackermann, C., Payne, N. A., Fate, G., Voorman, R., Williams, F. M. (2007) Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(2), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.002>.
- Johnson, C., Ahlberg, E., Anger, L. T., Beilke, L., Benigni, R., Bercu, J., Bobst, S., Bower, D., Brigo, A., Campbell, S., Cronin, M. K. D., Crooks, I., Cross, K. P., Doktorova, T., Exner, T., Fraulkner, D., Fearon, I. M., Fehr, M., Gad, S. C., Gervais, V., Giddings, A., Glowienke, S., Hardy, B., Hasselgren, C., Hillegass, J., Jolly, R., Krupp, E., Lomnitski, L., Magby, J., Metred, J., Milchak, L., Miller, S., Muster, W., Neilson, L., Parakhia, R., Parenty, A., Parris, P., Paulino, A., Paulino, A. T., Roberts, D. W., Schlecker, H., Stidl, R., Suarez-Rodriguez, D., Szabo, D. T., Tice, R. R., Urbisch, D., Vuorinen, A., Wall, B., Weiler, T., White, A. T., Whritenour, J., Wichard, J., Woolley, D., Zwickl, C. Myatt, G. J. (2020) Skin Sensitization *In Silico* Protocol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 116, 104688. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104688>

Jowsey, I. R., Basketter, D. A., Westmoreland, C. and Kimber, I. (2006) A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal. *Journal of Applied Toxicology*, 26(4), 341–350. <https://doi.org/10.1002/jat.1146>

Keenan, J. (2014) Are your sex toys safe? <https://playboysfw.kinja.com/chemical-romance-lack-of-regulation-may-make-sex-toys-1506699198> (citováno 5.2.2022).

KEMI (2017) Swedish Chemical Agency, New test shows nearly all sex toys free of restricted chemicals. <https://www.kemi.se/en/news-from-the-swedish-chemicals-agency/2017/new-test-shows-nearly-all-sex-toys-free-of-restricted-chemicals/> (citováno 5.1.2022).

Kimber, I., Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Dearman, R. J. (2002a) Allergic contact dermatitis. *International Immunopharmacology*, 2, 201-211. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00173-4)

Kimber, I., Dearman, R. J., Basketter, D. A., Ryan, C. A., Gerberick, G. F. (2002b) The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis*, 47(6), 315-328. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2002.470601.x>

Kimber, I., Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Dearman, R. J. (2011) Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicological Sciences*, 120(1), 238-68. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq346>

Kleinstreuer, N. C., Hoffmann, S., Alepee, N., Allen, D., Ashikaga, T., Casey, W., Clouet, E., Cluzel, M., Desprez, B., Gellatly, N., Göbel, C., Kern, P. S., Klaric, M., Kühnl, J., Martinozzi-Teissier, S., Mewes, K., Miyazawa, M., Strickland, J., van Vliet, E., Zang, Q., Petersohn, D. (2018) Non-animal methods to predict skin sensitization (II): An assessment of defined approaches. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(5), 359–374. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429386>

Kolarova, H., Nevrelva, P., Bajgar, R., Jirova, D., Kejlva, K., Strnad, M. (2007) In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicology in Vitro*, 21(2), 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.09.020>

Kolmanová, A. (2012) Alternativní metody tetsování. *Akademický bulletin*. <http://abicko.avcr.cz/2012/04/05/metody.html> (citováno 9. 7. 2021)

- Lalko, J. and Api, A. M. (2006) Investigation of dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay. *Food and Chemical Toxicology*, 44(5), 739-746. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.10.006>
- Lamas, J. P., Prado, L. S., Jares, C. G., Lores, M., Llompart, M. (2010) Development of a solid phase dispersion-pressurized liquid extraction method for the analysis of suspected fragrance allergens in leave-on cosmetics. *Journal of Chromatography A*, 1217(52), 8087-8094. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.120>
- Lehto, S., Buchweitz, M., Klimm, A., Straßburger, R., Bechtold, C., Ulberth, F. (2017) Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(3), 335–355. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1274431>
- Leo, L., Loong, C., Ho, X. L., Raman, M. F. B., Suan, M. Y. T., Loke, W. M. L. (2018) Occurrence of azo food dyes and their effects on cellular inflammatory responses. *Nutrition*, 46, 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.08.010>
- Lee, A. and Thomson, J. (1999) “Drug-induced Skin Reactions,” In *Adverse Drug Reactions*, Pharmaceutical Press, 262, 125–156.
- Li, X., Zheng, B. D., Peng, X. H., Li, S. Z., Ying, J. W., Zhao, Y., Huang, J. D., Yoon, J. (2019) Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews*, 379, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.003>
- Löbber, G. (2011) Phthalocyanines. In: *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 27(7), 181-213.
- Lopes, L. B., Garcia, M. T., Bentley, M. V. (2015) Chemical penetration enhancers. *Therapeutic Delivery*, 6(9), 1053–1061. <https://doi.org/10.4155/tde.15.6>
- Lotzer, K., Funk, K. D., Habenich, A. J. R. (2005) The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1736(1), 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.07.001>
- MacKay, C., Davies, M., Summerfield, V., Maxwell, G. (2013) From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment. *ALTEX*, 30(4), 473-486. <https://doi.org/10.14573/altex.2013.4.473>

- Martinková, L., Kořínková, R., Karásková, M., Vrtalová, M., Špelina, V. (2016) Alterbio – Environment friendly functional barrier textiles base on photoactive phthalocyanine dyeings. *Vlakna a Textil*, 23, 133–136.
- Marzulli, F. N., Maibach, H. I. (1976) Contact allergy: Predictive testing in man. *Contact Dermatitis*, 2(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1976.tb02972.x>
- Matwiejczuk, N., Galicka, A., Brzóška, M. M. (2020) Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 176–210. <https://doi.org/10.1002/jat.3917>.
- Matzinger, P. (1998) An innate sense of danger. *Seminars in Immunology*, 10(5), 399-415. <https://doi.org/10.1006/smim.1998.0143>
- McFadden, J. P. & Basketter, D. A. (2000) Contact allergy, irritancy and „danger“. *Contact Dermatitis*, 42(3), 123-127. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2000.042003123.x>
- Mehling, A., Eriksson, T., Eltze, T. Kolle, S., Ramirez, T., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2012) Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. *Archives of Toxicology*, 86, 1273-1295. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0867-6>
- Moreira, L. C., de Ávila, R. I., Veloso, D. F. M. C., Pedrosa, T. N., Lima, E. S., do Couto, R. O., Lima, E. M., Batista, A. C., de Paula, J. R., Valadares, M. C. (2017) In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixtures of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae): Prospects for developing a new dermocosmetic product. *Toxicology in Vitro*, 45(3), 397-408. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.002>
- Msagati, T. A. (2012) The chemistry of food additives and preservatives.
- Myers, D., Goldberg, A., Poth, A., Wolf, M. F., Carraway, J., McKim, J., Coleman, K. P., Hutchinson, R., Brown, R., Krug, H. F., Bahinski, A., Hartung, T. (2017) “From in vivo to in vitro: The medical device testing paradigm shift”, *ALTEX*, 34(4), 479-500. <https://doi.org/10.14573/altex.1608081>
- Natsch, A. (2010) The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers – functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicological Sciences*, 113(2), 284-292. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp228>

Natsch, A., Bauch, C., Foertsch, L., Gerberick, F., Morman, K., Hilberer, A., Inglis, H., Landsiedel, R., Onken, S., Reuter, H., Schepky, A., Emter, R. (2011) The intra-and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: Results of a ring-study in five laboratories. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 733-744. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.12.014>

Nilsson, N. H., Malmgren-Hansen, B., Bernth, N., Pedersen, E., Pommer, K. (2006) Survey and health assesment of chemicals substances in sex toys. Danish Technological Institute, Survey of Chemical Substances in Consumer Products. No. 77. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.512.9543&rep=rep1&type=pdf> (citováno 5. 1. 2022).

Nishijo, T., Miyazawa, M., Saito, K., Otsubo, Y., Mizumachi, H., Sakaguchi, H. (2019) Sensitivity of KeratinoSens™ and h-CLAT for detecting minute amounts of sensitizers to evaluate botanical extracts. *Journal of Toxicological Sciences*, 44(1), 13-21. <https://doi.org/10.2131/jts.44.13>

OECD (2010) Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090972-en>

OECD (2012) The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence Series on Testing and Assessment No.168 JT03321047. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Paris, France. <https://doi.org/10.1787/9789264221444-en>

OECD (2014) The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins; OECD Series on Testing and Assessment, No. 168; OECD Publishing: Paris, France. <https://doi.org/10.1787/9789264221444-en>

OECD (2017a) Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment, OECD Series on Testing and Assessment, No. 255, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264274822-en>.

OECD (2017b) Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment

(IATA) for Skin Sensitisation, OECD Series on Testing and Assessment, No. 256, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264279285-en>.

OECD (2018a) Test No. 442D: In vitro Skin sensitisation, ARENrf2 Luciferase Test Method. <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>

OECD (2018b) Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>

OECD (2018c) Safety of products sold online. <http://www.oecd.org/sti/consumer/safe-products-online/> (citováno 5. 1. 2022).

OECD (2019) Test No. 442C: In chemico Skin sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264229709-en>

OECD (2020) Case Study on use of an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) and New Approach Methods to Inform a Theoretical Read-Across for Dermal Exposure to Propylparaben from Cosmetics. Series on Testing and Assessment No. 320. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2020\)16&docLanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2020)16&docLanguage=en).

Otsubo, Y., Nishijo, T., Miyazawa, M., Saito, K., Mizumachi, H., Sakaguchi, H. (2017) Binary Test Battery With KeratinoSens™ and h-CLAT as Part of a Bottom-Up Approach for Skin Sensitization Hazard Prediction. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88, 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.06.002>

Ouyang, Q., Wang, L., Mu, Y., and Xie, X. Q. (2014) Modeling Skin Sensitization Potential of Mechanistically Hard-To-Be-Classified Aniline and Phenol Compounds with Quantum Mechanistic Properties. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15, 76. <https://doi.org/10.1186/2050-6511-15-76>

- Pedersen, S., Marra, F., Nicoli, S., Santi, P. (2007) In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 29(5), 361-367. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00388.x>.
- Petric, Z., Ružić, J., Žuntar, I. (2021) The controversies of parabens – an overview nowadays. *Acta Pharmaceutica*, 71(1), 17-32. <https://doi.org/10.2478/acph-2021-0001>.
- Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015) The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 901-916. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.009>
- Posadas, S. J., and Pichler, W. J. (2007) Delayed Drug Hypersensitivity Reactions - New Concepts. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(7), 989–999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02742.x>
- Purchase, I. F. H. (1986) Unpredictability: An essay in toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 24(4), 343-349. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90013-X)
- Rehfeld, A., Nylander, M., a Karnov, K. (2017) The Integumentary System. *Compendium of Histology*, 411–432. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41873-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41873-5_20)
- Reisinger, K., Hoffmann, S., Alepee, N., Ashikaga, T., Barrococ, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M.,Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2015) Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicology in Vitro*, 29(1), 259-270. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.018>
- Roberts, D. W. and Patlewicz, G. (2018) Non-animal Assessment of Skin Sensitization Hazard: Is an Integrated Testing Strategy Needed, and if So What Should Be Integrated? *Journal of Applied Toxicology*, 38(1), 41-50. <https://doi.org/10.1002/jat.3479>
- Rovida, C., Alepee, N., Api, A. M., Basketter, D. A., Bois, F. Y., Caloni, F., Corsini, E., Daneshian, M., Eskes, C., Ezendam, J., Fuchs, H., Hayden, P., Hegele-Hartung, Ch., Hoffmann, S., Hubesch, B., Jacobs, M. N., Jaworska, J., Kleensang, A., Kleistreuer, N.,

- Lalko, J., Landsiedel, R., Lebreux, F., Luechtefeld, T., Locatelli, M., Mehling, A, Natsch, A., Pitchford, J. W., Prater, D., Prieto, P., Schepky, A., Schürmann, G., Smirnova, L., Toole, C., van Vliet, E., Weisensee, D., Hartung, T. (2015) Integrated Testing Strategies (ITS) for safety assessment. *ALTEX*, 32(1), 25-40. <https://doi.org/10.14573/altex.1411011>
- Rubin, E. S., Deshpande, N. A., Vasquez, P. J., Kellogg, S. S. (2019) A Clinical Reference Guide on Sexual Devices for Obstetrician – Gynecologists, *Obstetrics & Gynecology*, 133(6), 1259-1268. <https://doi:10.1097/AOG.0000000000003262>.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959) *The principles of humane experimental technique*. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare.
- Sabzevari, N., Qiblawi, S., Norton, S. A., Fivenson, D. (2021) Sunscreens: UV filters to protect us: Part 1: Changing regulations and choices for optimal sun protection. *International Journal of Women's Dermatology*, 7(1), 28-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.05.017>
- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Yoneyama, K., Sono, S., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H. (2009) The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test – human cell line activation test (h-CLAT). *Cell Biology and Toxicology*, 25, 109–126. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9059-9>
- Sauer, U. G., Hill, E. H., Curren, R. D., Raabe, H. A., Kolle, S. N., Teubner, W., Mehling, A., Landsiedel, R. (2016) Local tolerance testing under REACH: accepted non-animal methods are not on equal footing with animal tests. *Alternatives to Laboratory Animals*, 44, 281-299. <https://doi.org/10.1177/026119291604400311>
- SCCNFP (2004) Evaluation and opinion on Acid Yellow 23, SCCNFP/0786/04.
- SCCS (2008) Opinion on 4-Methylbenzylidene camphor (4-MBC). SCCS/1184/08. [https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/scs\\_o\\_262.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_262.pdf) (citováno 19. 1. 2022).
- SCCS (2020a) Opinion on Benzophenone-3 (CAS No 131-57-7, EC No 205-031-5). SCCS/1625/20. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/scs\\_o\\_247.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_247.pdf) (citováno 19. 1. 2022).



SCCS (2020b) Opinion on Homosalate. SCCS/1622/20. [https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/scs\\_o\\_244.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_244.pdf) (citováno 19. 1. 2022).

SCCS (2021a) Opinion on Propylparaben (CAS No 94-13-3, EC No 202-307-7, SCCS/1623/20. [https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/scs\\_o\\_243.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_243.pdf) (citováno 9. 7. 2021).

SCCS (2021b) Opinion on Octocrylene (CAS No 6197-30-4, EC No 228-250-8), SCCS/1627/21. [https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/scs\\_o\\_249.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_249.pdf) (citováno 9. 7. 2021).

Schmidt, M., Raghavan, B., Muller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P. J., Galanos, C., Roth, J., Skerra, A., Martin, S. F., Freudenberg, M. A., Goebeler, M. (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel, *Nature Immunology*, 11, 814-819. <https://doi.org/10.1038/ni.1919>

Scott, L., Eskes, Ch., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alepée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, Ch., Spielmann, H., Stokes, W., Trouba K., Van den Berghe, Ch., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010) A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Botto-Up and Top-Down approaches. *Toxicology in Vitro*, 24(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.019>

Settivari, R. S., Gehen, S. C., Amado, R. A., Visconti, N. R., Boverhof, D. R., Carney, E. W. (2015) Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(2), 350-360. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.05.006>

Sevim, A. M., Ilgün, C., Gül, A. (2011) Preparation of heterogeneous phthalocyanine catalysts by cotton fabric dyeing. *Dyes and Pigments*, 89(2), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2010.10.008>

Sies, H. Berndt, C., Jones, D. P. (2017) Oxidative Stress. Annual Review of Biochemistry, 86, 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

Sloan, K. (2017) It's Surprisingly Hard to Ban Toxic Sex Toys, But Here's How to Protect Yourself. <https://www.glamour.com/story/protecting-yourself-from-toxic-sex-toys> (citováno 5. 1. 2022).

Soni, M. G., Taylor, S. L., Greenberg, N. A., Burdock, G. A. (2002) Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. Food and Chemical Toxicology, 40(10), 1335-1373. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00107-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00107-2).

Soni, M. G., Carabin, I. G., Burdock, G. A. (2005) Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). Food and Chemical Toxicology, 43(7), 985–1015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.020>

Steinemann A. C., MacGregor I. C., Gordon S. M., Gallagher L. G., Davis A. L., Ribeiro D. S., Wallace L. A. (2011) Fragranced consumer products: Chemicals emitted, ingredients unlisted. Environmental Impact Assessment Review, 31(3), 328-333. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2010.08.002>

Steinemann, A. (2017) Health and societal effects from exposure to fragranced consumer products. Preventive Medicine Reports, 5, 45-47. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2016.11.011>

Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D. M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., Warren, C. (2016) Integrated Decision Strategies for Skin Sensitization Hazard. Journal of Applied Toxicology, 36(9), 1150–1162. <https://doi.org/10.1002/jat.3281>

Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K. and Aiba, S. (2011) An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicological Sciences, 124(2), 359-369. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr237>

Thyssen, J. P., Menné, T., Linneberg, A., Johansen, J. D. (2009) Contact sensitization to fragrances in the general population: a Koch's approach may reveal the burden of disease. British Journal of Dermatology, 160(4), 729-735. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.09022.x>

- Tichotová, L. (2018) Masturbační aktivity a fantazie obyvatel České republiky. Disertační práce. Univerzita Karlova, Fylozofická fakulta, Katedra psychologie. Praha, 44-46. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/97797> (citováno 5. 1. 2022).
- Thyssen, J. P., Linneberg, A., Menné, T., and Johansen, J. D. (2007) The Epidemiology of Contact Allergy in the General Population - Prevalence and Main Findings. *Contact Dermatitis*, 57 (5), 287–299. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01220.x>
- Tomankova, K., Kejlova, K., Binder, S., Daskova, A., Zapletalova, J., Bendova, H., Kolarova, H., Jirova, D. (2011) *In vitro* cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. *Toxicology in Vitro*, 26(6), 1242-1250. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.026>
- Torgerson, R. R., Davis, M. D., Bruce, A. J., Farmer, S. A., Rogers, R. S., Minnesota, R. (2007) Contact allergy in oral disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(2), 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.04.017>
- Tourneix, F., Alepee, N., Detroyer, A., Eilstein, J., Ez-Zoubira, M., Martinozzi Teissier, S., Noçairi, H., Piroird, C., Basketter, D., Bufalo, A. (2020) Skin sensitisation testing in practice: Applying a stacking meta model to cosmetic ingredients. *Toxicology in Vitro*, 66, 104831. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104831>
- Uter, W., Werfel, T., Lepoittevin, J. P., White, I. R. (2020) Contact allergy – emerging allergens and public health impact. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7), 2404. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072404>
- Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015) Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 71(2), 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.12.008>
- Valks, R., Conde-Salazar, L. and Cuevas, M. (2004) Allergic contact urticaria from natural rubber latex in healthcare and non-healthcare workers. *Contact Dermatitis*, 50(4), 222-224. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2004.00327.x>
- Vandecasteele, H. A., Gautier, F., Tourneix, F., van Vliet, E., Bury, D., Alépée, N. (2021) Next generation risk assessment for skin sensitisation: A case study with propyl

paraben. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 123, 104936.  
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104936>

Wieck, S., Olsson, O., Kümmerer, K., Klaschka, U. (2018) Fragrance allergens in household detergents. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 97, 163-169.  
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.06.015>

Williams, W. C., Copeland, C. Boykin, E., Quell, S. J., Lehmann, D. M. (2015) Development and utilization of an ex vivo bromodeoxyuridine local lymph node assay protocol for assessing potential chemical sensitizers. *Journal of Applied Toxicology*, 35, 29-40.  
<https://doi.org/10.1002/jat.2983>

Yamashita, K., Miyazaki, H., Shinoda, S., Hagiwara, S., Takahashi, H., Itagaki, H. (2018) Assessment of the skin sensitizing potential of chemicals, contained in foods and/or cosmetic ingredients, using a modified local lymph node assay with an elicitation phase (LLNA:DAE) method. *The Journal of Toxicological Sciences*, 43(8), 513-520.  
<https://doi.org/10.2131/jts.43.513>

Zucco, F., de Angelis, I., Testai, E., Stamatii, A. (2004) Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicology in Vitro*, 18(2), 153-163.  
[https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00147-4)

## 7 Publikační činnost autora

### 7.1 Práce související s disertační prací

#### Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. Kejlová, K., Bendová, H., Chrz, J., Dvořáková, M., **Svobodová, L.**, Vlková, A., Kubáč, L., Kořínková, R., Černý, J., Očadlíková, D., Rucki, M., Heinonen, T., Jírová, D., Letašiová, S., Kandarova, H., Kolářová, H. (2020) Toxicological testing of a photoactive phthalocyanine-based antimicrobial substance. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* Volume, 115. **IF 2.996**
2. **Svobodova, L.**, Dvorakova, M., Rucki.M., Kejlova, K., Kandarova, H., Kolarova, H., Mannerstrom, M., Heinonen, T. (2020) Safety testing of adult novelties using *in vitro* methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 117. **IF 2.652**
3. **Svobodová, L.**, Rucki, M., Vlkova, A., Kejlova, K., Jírová, D., Dvorakova, M., Kolarova, H., Kandárová, H., Pôbiš, P., Heinonen, T. and Maly, M. (2021) Sensitization potential of medical devices detected by *in vitro* and *in vivo* methods. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, Volume 38, Issue 3, 419-430. **IF 6.043**

#### Publikovaná abstrakta

1. **Bělastová, L.**, Vlková, A., Rucki, M., Kejlová, K., Kolářová, H. (2019) Sensibilizující potenciál zdravotnických prostředků testovaný metodami in vitro a in vivo. 46. ročník Průmyslové toxikologie a ekotoxikologie 2019, 28. – 30. května 2019, Kouty nad Desnou. *Program a abstrakty* (Ed. Petra Plodíková), Univerzita Pardubice, Pardubice, s. 37.
2. **Bělastová, L.**, Dvořáková, M., Rucki, M., Kejlová, K., Kolářová, H. (2019) Hodnocení bezpečnosti erotických pomůcek metodami in vitro. 46. ročník Průmyslové toxikologie a ekotoxikologie 2019, 28. – 30. května 2019, Kouty nad Desnou. *Program a abstrakty* (Ed. Petra Plodíková), Univerzita Pardubice, Pardubice, s. 37.
3. **Bělastová, L.**, Dvořáková, M., Rucki, M., Kejlová, K., Kolářová, H. (2019) Safety testing of adult novelties using methods in vitro. *Abstracts: 24<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology 2019*, 26.-28. 6. 2019, Vyhne, Slovakia, Vol. 12, Supplementum 1, p. 17.

4. **Svobodová, L.**, Dvořáková, M., Rucki, M., Kejlová, K., Kolářová, H. (2019) Safety testing of adult novelties using methods *in vitro*. *Abstracts: 22<sup>nd</sup> European 3Rs Congress and the 19<sup>th</sup> EUSAAT Congress on Alternatives to Animal Testing*, October 10-13, 2019, University of Linz, Austria. *ALTEX Proceedings*, 2019, 8(1), p. 202.
5. **Svobodova, L.**, Rucki, M., Vlkova, A., Kejlova, K., Jirova, D., Dvorakova, M., Kolarova, H., Maly, M. and Heinonen, T. (2021) Sensitization Potential of Medical Devices Detected by *In Vitro* and *In Vivo* Methods. Preface and Abstracts of the JRC Summer School 2021, 17. – 21. 5. 2021, *ATLA* 49(6), 2021, p. 289-290.
6. **Svobodova, L.**, Rucki, M., Vlkova, A., Kejlova, K., Jirova, D., Dvorakova, M., Kolarova, H., Maly, M., Heinonen, T., Kandarova, H. (2021) Sensitization potential of medical devices detected by *in vitro* and *in vivo* methods. *Book of abstracts: RegToxInVitro – Dissemination and implementation of the OECD in vitro and in silico methods applicable to the safety and risk assessment of the chemicals, food, and feed*, May 24-25, 2021, Bratislava, Slovakia, p. 39-40.
7. **Svobodova, L.**, Rucki, M., Vlkova, A., Kejlova, K., Jirova, D., Dvorakova, M., Kolarova, H., Kandarova, H., Heinonen, T. (2021) Sensitization potential of medical devices detected by *in vitro* and *in vivo* methods. *Programme & Abstracts: 26<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicological Conference 2021*, 15.- 17. 9. 6. 2019, Stará Lesná, Slovakia, Vol. 14, Supplementum 1, p. 17.
8. **Svobodova, L.**, Rucki, M., Vlkova, A., Kejlova, K., Jirova, D., Dvorakova, M., Kolarova, H., Kandarova, H., Heinonen, T. (2021) Sensitization potential of medical devices detected by *in vitro* and *in vivo* methods. *Programme & Abstracts: 26<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology*, 15-17. 9. 2021, Stará lesná, Slovenská republika, Vol. 14, Supplementum 1, s. 17.
9. **Svobodová, L.**, Kejlová, K., Vlkova, A., Rucki, M., Maly, M., Jirova, D., Kolářová, H., Kandarova, H. and Heinonen, T. (2021) Sensitization potential of medical devices detected by methods *in vitro* and *in vivo*. *Abstracts of the 11<sup>nd</sup> World Congress Maastricht*, August 23 – September 2, 2021, *ALTEX Proceedings* 9(1), 2021, p. 249.
10. **Svobodova, L.**, Rucki, M., Vlkova, A., Kejlova, K., Jirova, D., Dvorakova, M., Kolarova, H. (2021) Sensitization potential of medical devices detected by *in vitro*

and *in vivo* methods. Sborník: 23. konference Společnosti pro vědu o laboratorních zvířatech 2021, 29. 9 – 1. 10. 2021, Olomouc, Česká republika, s. 13-14.

## 7.2 Ostatní publikace

### Publikace článků v odborných časopisech a sbornících s IF

1. Chrz, J., Hošíková, B., **Svobodová, L.**, Očadlíková, D., Kolářová, H., Dvořáková, M., Kejlová, K., Vlková, A., Jírová, G., Mannerstrom, M. (2020). Comparison of methods used for evaluation of mutagenicity/genotoxicity of model chemicals – parabens. *Physiological Research*, Volume 69, Supplementum 4, 661-679. **IF 1.655**
2. Rucki, M., Kejlova, K., Vlkova, A., Jirova, D., Dvorakova, M., **Svobodova, L.**, Kandarova, H., Letasiova, S., Kolarova, H., Mannerstrom, M., Heinonen, T. (2021) Evaluation of toxicity profiles of rare earth elements salts (lanthanides). *Journal of Rare Earths*, Volume 39, Issue 2, 225-232. **IF 2.846.**

### Publikace abstrakt ze zahraničních konferencí v časopisech a sbornících

1. Jírová, D., Kejlová, K., Dvořáková, M., **Bělástová, L.**, Chrz, J., Rucki, M. (2019) 3RS centre at the National Institute of Public Health in the Czech republic. *Abstracts: 24<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology 2019*, 26.-28. 6. 2019, Vyhne, Slovakia, Vol. 12, Supplementum 1, p. 17.
2. Rucki, M., **Bělástová, L.**, Vlková, A., Kejlová, K., Jírová D. (2019) Feasibility of direct peptide reactivity assay (DPRA) in evaluation of sensitization potential of chemicals and mixtures. *Abstracts: 24<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology 2019*, 26.-28. 6. 2019, Vyhne, Slovakia, Vol. 12, Supplementum 1, p. 17.
3. Jírová, D., Kejlová, K., Dvořáková, M., **Svobodová, L.**, Chrz, J., Rucki, M. (2019) 3RS centre at the National Institute of Public Health in the Czech republic. *Abstracts: 22<sup>nd</sup> European 3Rs Congress and the 19<sup>th</sup> EUSAAT Congress on Alternatives to Animal Testing*, October 10-13, 2019, University of Linz, Austria. *ALTEX Proceedings*, 2019, 8(1), p. 88.
4. Dvořáková, M., **Svobodová, L.**, Rucki, M., Chrz, J., Ševčík, V., Jírová, D. (2019) Cosmetic perfumes and their potential of endocrine disruption, sensitization and genotoxicity. *Abstracts: 22<sup>nd</sup> European 3Rs Congress and the 19<sup>th</sup> EUSAAT Congress on Alternatives to Animal Testing*, October 10-13, 2019, University of Linz, Austria. *ALTEX Proceedings*, 2019, 8(1), p. 46.

5. Dvořáková, M., Kejlová, K., **Bělástová, L.**, Rucki, M., Chrz, J., Jírová, D. (2019) Safety of Consumer Products Assessed by a Combination of Novel Bioassays. *Abstracts: 2019 International Conference on Advances in Biological Science and Technology, (ICABST 2019)*, 26-28 December 2019 Bangkok, Thailand, Vyhne, Vol. 126, Issue S5 1, p. 11.
6. Jírová, D., Kejlová, K., Dvořáková, M., Vlková, A., **Svobodová, L.** (2021) 3Rs Centre Czech Republic at National Institute of Public Health in Prague. *Book of abstracts: RegToxInVitro – Dissemination and implementation of the OECD in vitro and in silico methods applicable to the safety and risk assessment of the chemicals, food, and feed*, May 24-25, 2021, Bratislava, Slovakia, p. 30.
7. Rucki, M., **Svobodová, L.**, Jírová, D., Kejlová, K. (2021) Classification of a substance sensitization potency into UN GHS sub-categories 1A and 1B using the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA). *Programme & Abstracts: 26<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicological Conference 2021*, 15.- 17. 9. 6. 2019, Stará Lesná, Slovakia, Vol. 14, Supplementum 1, p. 18.
8. **Svobodová, L.**, Bendová, H., Cerny, J., Kejlova, K., Goffova, G., Kasparova, L., Jirova, D., Vrkoslavova, J., Kolarova, H. and Kubac, L. (2022) Skin Penetration of novel antimicrobial substance based on silver. Abstracts of presentations at the Seventeenth International Perspective in Percutaneous Penetration Conference, 18. – 22. 4. 2022, La Grande Motte, France, Vol. 17, p. 43.

#### **Publikace abstrakt ve sbornících z tuzemských konferencí s mezinárodní účastí**

1. Jírová, D., Dvořáková, M., Ševčík, V., **Svobodová, L.** (2019) Potential Health Risks of Perfume Products. *Proceeding of International Conference of Cosmetology* (Eds. J. Hojerová, M. Staroň), October 2-4, 2019, Luhačovice, Česká republika, p. 28-29.
2. Bendová, H., Kejlová, K., Vrkoslavová, J., Jírová, D., Jedličková, L., Dvořáková, M., **Svobodová, L.**, Marková, R. (2019) AgNOS – an Antimicrobial Substance Based on Silver – Safety and Efficacy. *Proceeding of International Conference of Cosmetology* (Eds. J. Hojerová, M. Staroň), October 2-4, 2019, Luhačovice, Česká republika, s. 30.
3. Chrz, J., Hošíková, B., **Svobodová, L.**, Očadlíková, D., Kolářová, H., Dvořáková, M., Kejlová, K., Vlková, A., Jírová, G., Mannerstrom, M. (2020). In vitro methods used for evaluation of mutagenicity/genotoxicity of selected parabens. *Programme*



& Abstracts: 25<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology 2020, 3-5. 9. 2020, Praha, Česká Republika, Vol. 13, Supplementum 1, p. 23.

4. Kand'árová, H., Jírová, D., Neuhaus, W., Kejlová, K., Dvořáková, M., **Svobodová, L.**, Moulisová, A., Lin, G., Pôbiš, P. (2020). In vitro three-dimensional reconstructed human tissue models in the biokompatibility assessment of medical devices with intended use in the oral cavity: Launch of the international project train-safemds. *Programme & Abstracts: 25<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology 2020, 3-5. 9. 2020, Praha, Česká Republika, Vol. 13, Supplementum 1, s. 53.*
5. Rucki, M., **Svobodová, L.**, Jírová, D., Kejlová, K. (2021) Classification of a substance sensitization potency into un GHS sub-categories 1A and 1B using the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). *Programme & Abstracts: 26<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology, 15-17. 9. 2021, Stará lesná, Slovenská republika, Vol. 14, Supplementum 1, s. 18.*

## **Příloha č. 1**

### **Toxicological testing of a photoactive phthalocyanine-based antimicrobial substance**

Kristina Kejlová, Hana Bendová, Jan Chrz, Markéta Dvořáková, **Lada Svobodová**, Alena Vlková, Lubomír Kubáč, Radka Kořínková, Jiří Černý, Danuše Očadlíková, Marian Ruckia Tuula, Heinonen, Dagmar Jírová, Silvia Letašiová, Helena Kandarova, Hana Kolářová

Regulatory Toxicology and Pharmacology 115 (2020) 104685

IF 2,996



Contents lists available at ScienceDirect

Regulatory Toxicology and Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yrtph](http://www.elsevier.com/locate/yrtph)

## Toxicological testing of a photoactive phthalocyanine-based antimicrobial substance



Kristina Kejllová<sup>a,\*</sup>, Hana Bendová<sup>a</sup>, Jan Chrz<sup>a,c</sup>, Markéta Dvořáková<sup>a</sup>, Lada Svobodová<sup>a,c</sup>, Alena Vilková<sup>a</sup>, Lubomír Kubáč<sup>b</sup>, Radka Kořínková<sup>b</sup>, Jiří Černý<sup>b</sup>, Danuše Očadlíková<sup>a</sup>, Marian Rucki<sup>a</sup>, Tuula Heinonen<sup>f</sup>, Dagmar Jírová<sup>a</sup>, Silvia Letašiová<sup>d</sup>, Helena Kandarová<sup>e</sup>, Hana Kolářová<sup>c</sup>

<sup>a</sup> National Institute of Public Health, Centre of Toxicology and Health Safety, Šrobárova 49/48, 100 00, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Center of Organic Chemistry, Rybářův Lp. 296, 533 54, Rybářův, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Medical Biophysics, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hejlovská 3, 775 15, Olomouc, Czech Republic

<sup>d</sup> MatFak in Vitro Life Science Laboratories, Mlynské Nivy 73, 82 105, Bratislava, Slovakia

<sup>e</sup> Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Centre of Experimental Medicine, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská Cesta 9, 841 04, Bratislava, Slovakia

<sup>f</sup> IRCAM, Faculty of Medicine and Health Technology, RS-33014, Tampere University, Tampere, Finland

### ARTICLE INFO

#### Keywords

Aluminium phthalocyanine  
Phototoxicity  
Local toxicity  
Systemic toxicity  
Skin penetration

### ABSTRACT

The aim of the study was toxicological testing of an innovative and efficient antimicrobial agent based on photoactive phthalocyanine (Pc) derivative. A promising Aluminium phthalocyanine (AlPc) with efficient and stable antimicrobial effects was subjected to a battery of toxicological tests to avoid local and systemic toxicity hazard. In compliance with the current European legislation restricting the use of experimental animals, the methods comprised exclusively *in vitro* procedures based on cellular and tissue models of human origin or mimicking human tissues. The battery of toxicological tests to identify local toxicity included skin corrosion/irritation, eye irritation, and phototoxicity. The basic systemic toxicity tests included acute toxicity, skin sensitization, genotoxicity, and endocrine disruption. The results showed that AlPc induced skin and eye irritation, exhibited borderline sensitization potential and mutagenic potential in one test strain of the Ames test, which was not confirmed in the chromosome aberration test. The AlPc was found to be phototoxic. The results from the cytotoxicity test designed for acute oral toxicity estimation were not conclusive, the acute toxicity potential has to be determined by conventional tests *in vivo*. Regarding endocrine disruption, no agonistic activity of the AlPc on human estrogen receptor  $\alpha$ , nor human androgen receptor was observed. The skin penetration/absorption test revealed that the AlPc has not penetrated into the dermis and receptor fluid, confirming no risk of systemic exposure via the bloodstream.

### 1. Introduction

Protection of consumer products such as food contact plastics, coatings, cosmetics and textiles against undesirable microbial attack requires innovative agents with a wide spectrum of efficiency, long term stability and safety of use. These requirements are often difficult to meet when using current biocides and antimicrobials. The aim of the ongoing research project was to identify and select innovative and

effective antimicrobial agents, based on photoactive phthalocyanine (Pc) derivatives, without undesirable effects on human health and the environment.

Phthalocyanine is an 18  $\pi$ -aromatic macrocycle consisting of four isoindoline units connected via azomethine bridges. In the central cavity, various metal cations can be incorporated forming metal phthalocyanines. Since their first report as colored impurity in 1907 by Braun and Tcherniac (1907), Pcs have been used and studied for many

**Abbreviations:** ER $\alpha$ , estrogen receptor  $\alpha$ ; ER $\beta$ , estrogen receptor  $\beta$ ; ERTA, Estrogen Receptor Transactivation Assay; FI, fold induction; HET-CAM, Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane; IS, irritancy score; MAS, metabolic activation system; MPE, Mean Photo Effect; MI, mutagenic index; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; NR, neutral red; OD, optical density; PAFSES; 2-[(4-aminophenyl)sulfonyl]ethyl hydrogen sulfate; PBS, phosphate buffered saline; Pc, phthalocyanine; PIF, Photoinitiation Factor; SCCO, standard cell culture conditions (temperature 37  $\pm$  1  $^{\circ}$ C, relative humidity 95  $\pm$  5%, CO $_2$  level 5  $\pm$  1%)

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [kristina.kejllova@szu.cz](mailto:kristina.kejllova@szu.cz) (K. Kejllová), [helena.kandarova@jvavbask](mailto:helena.kandarova@jvavbask) (H. Kandarová).

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104685>

Received 29 April 2020; Accepted 11 May 2020

Available online 23 May 2020

0273-2300/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

## **Příloha č. 2**

### **Safety testing of adult novelties using *in vitro* methods**

**L. Svobodova, M. Dvorakova, M. Rucki, K. Kejlova, H. Kandarova, H. Kolarova, M. Mannerstrom, T. Heinonen**

Regulatory Toxicology and Pharmacology 117 (2020) 104780

IF 2,652



Contents lists available at ScienceDirect

## Regulatory Toxicology and Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yrtph](http://www.elsevier.com/locate/yrtph)Safety testing of adult novelties using *in vitro* methodsL. Svobodova<sup>a,b,\*</sup>, M. Dvorakova<sup>a,c</sup>, M. Rucki<sup>a</sup>, K. Kejlova<sup>a</sup>, H. Kandarova<sup>d,e</sup>, H. Kolarova<sup>b</sup>, M. Mannerstrom<sup>f</sup>, T. Heinonen<sup>f</sup><sup>a</sup> National Institute of Public Health, Prague, Šrobárova 48/49, 100 00, Prague 10, Czech Republic<sup>b</sup> Department of Medical Biophysics, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc, Czech Republic<sup>c</sup> Charles University in Prague, Third Faculty of Medicine, Ruskič 87, 100 00, Prague 10, Czech Republic<sup>d</sup> Centre of Experimental Medicine, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská Cesta 9, 841 04, Bratislava, Slovakia<sup>e</sup> Institute of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovakia<sup>f</sup> FICAM, Faculty of Medicine and Health Technology, FI-33014 Tampere University, Tampere, Finland

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Chemical mixtures safety  
*In vitro* toxicology  
Cytotoxicity  
Skin sensitization  
Endocrine disruption  
Public health  
Risk assessment  
Sex toy industry

## ABSTRACT

Despite widespread and prolonged use of adult novelties, their health safety is not regularly tested or legally regulated. In the EU, adult novelties are subjected to the General Product Safety Directive, placing the burden of proof regarding safe products onto the manufacturers. The aim of our pilot study was to expand knowledge on potential application of *in vitro* methods for hazard prediction of extracts from final products. We subjected extracts of 20 adult novelties, purchased on the Czech market to toxicological tests including NRU cytotoxicity assay, sensitization tests DPRA and LuSens and the YES/YAS endocrine assay. Four samples produced cytotoxicity, sensitization potential was recorded by DPRA (three samples) while the LuSens reported ten samples. Regarding endocrine disruption, three samples produced antiestrogen and antiandrogen effects. Six samples exhibited androgenic potential and one sample showed estrogenic potential. Positive results with possible health effects were recorded repeatedly for samples made of ABS, PVC and latex. The study has confirmed promising usefulness of our test methods combination with regard to safety testing of this type of consumer products. The results should be evaluated with care, however, the data bring added-value to the limited knowledge of mixture toxicology and are indicative for further testing.

## 1. Introduction

The first adult novelties (or so-called sex toys, intimacy products, marital aids, erotic adult products) in human history appeared in ancient times (Rubin et al., 2019). A siltstone phallus is quoted as being the oldest known sex toy ever discovered. Phalluses made from stone, wood, bone, leather, bronze, chalk, bread, and even camel dung coated in resin have been found or referenced in historical texts and images. During the Renaissance these aids were reportedly widely known, typically made of

leather and used with olive oil for lubrication. High class members of society even displayed their sex toys, often made from silver, gold and ivory (Fogarty, 2017; MedNEWS, 2016; Woollaston, 2015). In the 1950s, the vibrator lost the status of a medical device and was considered a purely sexual erotic aid, however, sex was not spoken about publicly at that time and so even erotic aids were taboo and their sales and development have diminished. Following the sexual revolution in the 1970s, numerous new manufacturers emerged developing novel designs, materials and features. At this time the first latex, plastic and gel

Abbreviations: ABS, Acrylonitrile butadiene styrene; ACD, Allergic contact dermatitis; BBP, Benzyl butyl phthalate; DBP, Dibutyl phthalate; DEHP, Di(2-ethylhexyl)phthalate; DHT, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone; DIBP, Diisobutyl phthalate; DINP, Diisononyl phthalate; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMSO, Dimethyl sulfoxide; DNOP, Di-n-octyl phthalate; DPRA, Direct Peptide Reactivity Assay; DOP, Dioctylphthalate; DTDP, Ditridecyl phthalate; E, 17- $\beta$  estradiol; FDA, Food and Drug Administration; FI, Flutamide; FTIR, Fourier Transform Infrared; HPLC, High performance liquid chromatography; hER $\alpha$ , Human estrogen receptor  $\alpha$ ; hAR, Human androgen receptor; HT, 4-Hydroxytamoxifen; OD, optical density; PVC, polyvinyl chloride; TINTM, Trinonyl benzene-1,2,4-tricarboxylate.

\* Corresponding author. 49/48, Prague 10, 100 00, Czech Republic.

E-mail addresses: [lada.svobodova@szu.cz](mailto:lada.svobodova@szu.cz) (L. Svobodova), [maketa.dvorakova@szu.cz](mailto:maketa.dvorakova@szu.cz) (M. Dvorakova), [marian.rucki@szu.cz](mailto:marian.rucki@szu.cz) (M. Rucki), [kristina.kejlova@szu.cz](mailto:kristina.kejlova@szu.cz) (K. Kejlova), [helena.kandarova@savba.sk](mailto:helena.kandarova@savba.sk) (H. Kandarova), [hana.kolarova@upol.cz](mailto:hana.kolarova@upol.cz) (H. Kolarova), [marika.mannerstrom@tuni.fi](mailto:marika.mannerstrom@tuni.fi) (M. Mannerstrom), [tuula.heinonen@tuni.fi](mailto:tuula.heinonen@tuni.fi) (T. Heinonen).

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104780>

Received 16 January 2020; Received in revised form 18 August 2020; Accepted 1 September 2020

Available online 6 September 2020

0273-2300/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

### **Příloha č. 3**

## **Sensitization Potential of Medical Devices Detected by *In Vitro* and *In Vivo* Methods**

**Lada Svobodová**, Marian Rucki, Alena Vlkova, Kristina Kejlova, Dagmar Jírová, Marketa Dvorakova, Hana Kolarova, Helena Kandárová, Peter Pôbiš, Tuula Heinonen and Marek Maly

ALTEX 38 (3), 2021

IF 6,043



## Research Article

# Sensitization Potential of Medical Devices Detected by *In Vitro* and *In Vivo* Methods

Lada Svobodová<sup>1,2</sup>, Marian Rucki<sup>1</sup>, Alena Vlková<sup>1</sup>, Kristina Kejlova<sup>1</sup>, Dagmar Jirová<sup>1</sup>, Marketa Dvorakova<sup>1</sup>, Hana Kolarova<sup>2</sup>, Helena Kandárová<sup>3,4</sup>, Peter Póbiš<sup>4</sup>, Tuula Heinonen<sup>5</sup> and Marek Malý<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc, Czech Republic; <sup>3</sup>Centre of Experimental Medicine, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; <sup>4</sup>Institute of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovakia; <sup>5</sup>FICAM, Faculty of Medicine and Health Technology, Tampere University, Tampere, Finland

### Abstract

Medical devices must be tested before marketing in accordance with ISO EN 10993-10 in order to avoid skin sensitization. This standard predominantly refers to the *in vivo* test but does not exclude the use of *in vitro* methods that have been sufficiently technically and scientifically validated for medical device testing. It is foreseen that, due to the complexity of the sensitization endpoint, a combination of several methods will be needed to address all key events occurring in the sensitization process. The objective of this pilot study was to evaluate the sensitization potential of selected medical devices using a combination of *in chemico* (DPRA, OECD TG 442C) and *in vitro* (LuSens, OECD TG 442D) methods in comparison with the *in vivo* (LLNA DA, OECD TG 442A) method and to suggest a possible testing strategy for the safety assessment of medical device extracts. Overall, one of the 42 tested samples exhibited positive results in all employed test methods, while 33 samples were predicted as non-sensitizing in all three performed methods. This study demonstrated good agreement between *in vitro* and *in vivo* results regarding non-sensitizing samples; however, some discrepancies in positive classification were recorded. A testing strategy is suggested in which negative results are accepted and any positive results in the *in chemico* or *in vitro* tests are followed up with a third *in vitro* test and evaluated in accordance with the “2 out of 3 approach”. This strategy may reduce and replace animal use for testing the sensitization potential of medical devices.

## 1 Introduction

A medical device (MD) is defined as any instrument, apparatus, implant or material intended by the producer to be used, separately or in combination, for specific medical uses, e.g., diagnosis, monitoring, cure of disease or injury, adjustment or support of the anatomy or physiological process, assisting or maintaining life, or control of conception (WHO, 2020). The broad spectrum of medical devices, comprising catheters, gloves, blood bags, wound dressings, tissue engineering articles, etc., is globally increasing, and a high rate of research and progress in this area has been recently reported (Myers et al., 2017). Medical devices usually contain diverse materials such as plastics, cotton, rubber, latex, gels, metallic alloys or biological derivatives (Goud, 2017). They may be in contact with the human body for a short period ( $\leq 24$  h), for a prolonged period ( $> 24$  h to 30 days) or permanently ( $> 30$  days).

With the aim to ensure safety for the end-users of MDs, all incoming marketed articles have to be tested according to “Biological evaluation of medical devices” (ISO 10993), which contains a collection of standards for evaluating MDs for the purpose of managing biological risks (ISO, 2009; Strickland et al., 2019). The range of endpoints for biocompatibility evaluation is defined by the nature of body contact (e.g., contact with healthy skin vs with damaged skin vs implanted device in bone or tissue) and time persistence (e.g., short term vs long term application/contact). Three fundamental items of information obligatory for all types of MDs comprise data on their cytotoxicity, sensitization and irritation/intracutaneous reactivity.

Skin sensitization is defined as a dermal reaction initiated by immunological responses to a chemical or material, which lead to a delayed-type hypersensitivity response after cutaneous contact and subsequent penetration into the epidermis, resulting in allergic contact dermatitis (OECD, 1992; Basketter et al., 2005). During

Received August 14, 2020; Accepted January 11, 2021;

Epub January 26, 2021; © The Authors, 2021.

ALTEX 38(3), 419–430. doi:10.14573/altex.2008142

Correspondence: Lada Svobodová, M.Sc.  
Centre of Toxicology and Health Safety, National Institute of Public Health  
Srobarova 49/48, Prague 10, 100 00, Czech Republic  
(lada.svobodova@szu.cz)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is appropriately cited.