

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ ÚČINKY FAKTORŮ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ NA KŮŽI

RNDr. Hana Bendová

Školitel: Doc. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré použité zdroje a literaturu.

Praha, 2010

.....

Děkuji své školitelce Doc. RNDr. Haně Kolářové, CSc, za odborné vedení disertační práce a cenné rady v průběhu studia.

Dále děkuji MUDr. Dagmar Jírové CSc. za poskytnuté rady při experimentální práci a vyhodnocení výsledků a RNDr. Kristině Kejlové za poskytnuté výsledky ze studií in vitro. Rovněž děkuji kolektivu oddělení Laboratoří biomedicíny a oddělení Toxikologie in vitro, Státní zdravotní ústav Praha, za pomoc při experimentální práci. Za analýzy provedené na plynovém chromatografu děkuji ing. Petru Gajdošovi a ing. Radku Lehnertovi, Státní zdravotní ústav Praha. Za spektrofotometrické analýzy děkuji Ing. Lubomíru Kubáčovi, Výzkumný ústav organických syntéz, Pardubice.

Tato práce byla podporována grantovými projekty EU COOP-CT-2005-513216, MPO ČR č. FT-TA 3/050 a IGA MZ ČR č.9648-4/2008.

Obsah

Seznam zkratek.....	7
1. Úvod.....	9
2. Kůže.....	11
2.1. Stavba kůže.....	11
2.2. Fyziologie kůže.....	13
2.3. Penetrace látek kůží.....	15
2.3.1. Makro cesty penetrace.....	15
2.3.2. Mikro cesty penetrace.....	16
3. Fyzikální faktory vnějšího prostředí.....	17
3.2. Teplo, chlad, vlhkost prostředí, vítr, voda.....	17
3.3. Sluneční záření.....	17
3.4. Účinky ultrafialového záření na kůži.....	20
3.4.1. Časný typ účinků.....	20
3.4.2. Pozdní typ účinků.....	21
3.4.3. Fototoxicita.....	22
3.4.4. Hodnocení potenciálu fototoxicity.....	23
4. Chemické faktory vnějšího prostředí.....	26
4.1. Povrchově aktivní látky.....	26
4.2. Esenciální oleje.....	29
4.3. Fototoxicita rostlinných substancí.....	30
4.4. Iritační kontaktní dermatitida.....	31
4.5. Zkoušení kožní dráždivosti.....	33
5. Aktivní látky v kosmetických prostředcích.....	36
5.1. Filtry ultrafialového záření.....	37
5.1.1. Vlastnosti UV filtrů.....	37
5.1.2. Chemické UV filtry.....	39
5.1.3. Fyzikální UV filtry.....	39
5.1.4. Značení SPF a UVA-PF u prostředků na ochranu proti slunečnímu záření.....	40
5.1.5. Stanovení SPF in vivo a UVA-PF in vivo a in vitro.....	41
5.2. Rostlinné ingredience.....	43
5.2.1. Aloe vera - Aloe barbadensis.....	44

5.2.2. Zelený čaj - <i>Camellia sinensis</i>	45
5.2.3. Ječmen a výtažky z ječmenného sladu - <i>Hordeum vulgare</i>	47
5.2.4. Pšenice obecná - <i>Triticum vulgare</i>	48
5.2.5. Bazalka posvátná - <i>Ocimum sanctum</i>	50
5.2.6. Ostropestřec mariánský - <i>Silybum marianum</i>	51
5.2.7. Heřmáněk pravý - <i>Matricaria recutita</i>	52
6. Experimentální část.....	54
6.1. Cíle práce.....	54
6.1.1. Penetrace/absorpce a účinnost Cosolu E.....	54
6.1.2. Penetrace/absorpce a fototoxicita éterických olejů.....	54
6.1.3. Hydratační účinky aloe vera.....	54
6.1.4. Ochranné účinky rostlinných ingrediencí.....	55
6.2. Materiál a metodika.....	55
6.2.1. Penetrace / absorpce.....	55
6.2.1.1. Penetrace / absorpce kůže - metodika.....	56
6.2.1.2. Způsob aplikace a analýza éterických olejů.....	58
6.2.1.3. Způsob aplikace a analýza Cosolu E.....	59
6.2.2. Fototoxicita.....	61
6.2.2.1. Chromatografická analýza éterických olejů.....	62
6.2.2.2. Test fototoxicity ve skupině dobrovolníků.....	62
6.2.3. Stanovení SPF u fotoprotektivních emulzí.....	63
6.2.3.1. Spektrální křivka Cosolu E.....	64
6.2.3.2. Stanovení SPF in vivo - metodika.....	65
6.2.4. Hydratace.....	68
6.2.4.1. Stanovení hydratace - metodika.....	68
6.2.5. Ochranné účinky rostlinných extraktů.....	70
6.2.5.1. Metody in vitro.....	70
6.2.5.1.1. Zkouška cytotoxicity 3T3 NRU.....	70
6.2.5.1.2. Modifikovaná zkouška dráždivosti na rekonstruovaném modelu lidské kůže.....	71
6.2.5.2. Metoda in vivo.....	71
6.3. Výsledky.....	73
6.3.1. Éterické oleje.....	73
6.3.1.1. Chromatografická analýza éterických olejů.....	73

6.3.1.2. Test fototoxicity ve skupině dobrovolníků.....	76
6.3.1.3. Penetrace éterických olejů.....	78
6.3.1.4. Diskuse.....	82
6.3.2. UV filtr Cosol E.....	85
6.3.2.1. Penetrace / absorpce Cosolu E.....	85
6.3.2.2. Stanovení SPF fotoprotektivních emulzí.....	88
6.3.2.3. Diskuse.....	92
6.3.3. Stanovení hydratace.....	93
6.3.3.1. Stanovení hydratace výrobků Amay.....	93
6.3.3.1.1. AMAY Cream - jednorázová aplikace.....	93
6.3.3.1.2. AMAY Cream - opakovaná aplikace.....	94
6.3.3.2. Stanovení hydratace výrobků Aloe Vita.....	95
6.3.3.2.1. ALOE VITA Cream - jednorázová aplikace.....	95
6.3.3.2.2. ALOE VITA Cream - opakovaná aplikace.....	96
6.3.3.3. Diskuse.....	97
6.3.4. Stanovení ochranných účinků rostlinných extraktů.....	99
6.3.4.1. Cytotoxicita 3T3 NRU pro SLS.....	99
6.3.4.2. Cytotoxicita 3T3 NRU - účinnost aktivních látek.....	100
6.3.4.3. Modifikovaná zkouška dráždivosti na rekonstruovaném modelu lidské kůže - účinnost aktivních látek.....	101
6.3.4.4. Zkouška ve skupině dobrovolníků - účinnost aktivních látek.....	101
6.3.4.5. Diskuse.....	103
7. Závěr.....	105
8. Souhrn.....	107
9. Seznam literatury.....	109
10. Publikační činnost autora.....	120

Seznam zkratk

3T3 NRU PT	Zkouška fototoxicity 3T3 NRU
ANOVA	metoda analýzy rozptylu
CEN	European Committee for Standardization
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Sciences
COLIPA	Asociace výrobců kosmetiky
DMEM	Dulbeccova modifikace esenciálního media
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECVAM	Evropské centrum pro validaci alternativních metod
ES	Evropské společenství
EU	Evropská unie
IKI	index kožní iritace
ISO	International Organization for Standardization
LSD	least significant difference
MED	Minimal Erythema Dose - minimální erytémová dávka
MED _u	Minima erythema dose unprotected - minimální erytémová dávka na neošetřené kůži
MPD	Minimal Pigmentation Dose - minimální dávka způsobující pigmentaci kůže
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid
NR	neutral red - neutrální červeň
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PAL	povrchově aktivní látky
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfátem
REACH	Registrace, evaluace (hodnocení) a autorizace (povolování) chemických látek
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCCNFP	The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products
SCCP	Scientific Committee on Consumer Products
SIFT	Skin Integrity Function Test
SLS	laurylsíran sodný
SPF	Sun Protection Factor - ochranný sluneční faktor

UV	ultrafialové záření 100 - 400 nm
UVA	ultrafialové záření 320 - 400 nm
UVA-PF	UVA Protection Factor - ochranný faktor proti UVA složce záření
UVB	ultrafialové záření 290 - 320 nm
UVC	ultrafialové záření 100 - 290 nm
vis	viditelné záření

1. ÚVOD

Ochrana a podpora zdraví populace je prioritním cílem politiky Evropského společenství. Prostředky aplikované na kůži člověka představují účinný nástroj v ochraně před nepříznivými vlivy životního a pracovního prostředí. Klimatické vlivy a zejména sluneční záření, látky chemické i biologické povahy mohou způsobovat poškození kožní bariéry, které usnadňuje průnik iritantů, alergenů, mikrobu a jiných nox vnějšího prostředí do epidermis. Jednou z nejdůležitějších funkcí kůže je zbránit penetraci nox vnějšího prostředí do organismu.

Formulace kosmetických prostředků obsahují pečlivě vybrané ingredience na základě předpokládaných vlastností a účinku finálního výrobku. Jednou z nejsledovanějších skupin ingrediencí používaných v kosmetických prostředcích jsou parfémové kompozice. V současné době je jako složka parfémů používáno více než 6000 látek jak přírodního (éterické oleje) tak syntetického původu. Iritální i alergická kontaktní dermatitida navozená složkami parfémů je častý problém, který nemusí být způsobený pouze používáním kosmetických prostředků, neboť řada těchto látek je používána jako složky parfémů i v prostředcích domácí a bytové chemie. Součástí vyhodnocení bezpečnosti těchto látek v kosmetických prostředcích jsou i údaje o jejich koncentraci ve výrobku, údaje o penetraci a fototoxickém / fotoalergickém potenciálu.

Na ochranu proti škodlivým účinkům slunečního záření na kůži jsou používány filtry ultrafialového záření. Současným trendem je přechod od používání filtrů UV záření, které filtrují buď UVA nebo UVB složku záření k fotostabilním širokopásmovým UV filtrům snižujícím celkovou zátěž organismu. Jako UV filtry lze použít pouze látky uvedené na pozitivním seznamu povolených UV filtrů pro kosmetické prostředky, který v současné době obsahuje 27 látek. Zařazení nově vyvinutých UV filtrů na seznam povolených látek předchází posouzení jejich kompletního toxikologického profilu Vědeckým výborem pro bezpečnost spotřebitele.

Aktivní složky rostlinného původu jsou běžnou součástí receptur kosmetických prostředků určených pro osoby s citlivou nebo suchou kůží, za účelem zlepšení stavu a vzhledu kůže a minimalizace nežádoucích účinků. Ve formulacích tenzidových kosmetických prostředků jsou používány z důvodu snížení jejich případného potenciálu iritace. Další z významných účinků některých rostlinných ingrediencí, zejména na bázi aloe vera, je jejich účinek hydratační. Dobře

hydratovaná kůže, zejména její rohová vrstva, plní jednu ze svých nejdůležitějších funkcí, a to ochranu organismu před vlivy zevního prostředí. Současné výzkumy ukazují, že bariéra bránící průniku látek do kůže není na kožním povrchu, ale je lokalizovaná v rohové vrstvě.

Kosmetické prostředky s obsahem antioxidantů, lapačů radikálů a látek omezujících, případně zabraňujících podráždění kůže vlivem fyzikálních, chemických a biologických faktorů vnějšího prostředí, jsou významnou součástí každodenní péče o pokožku.

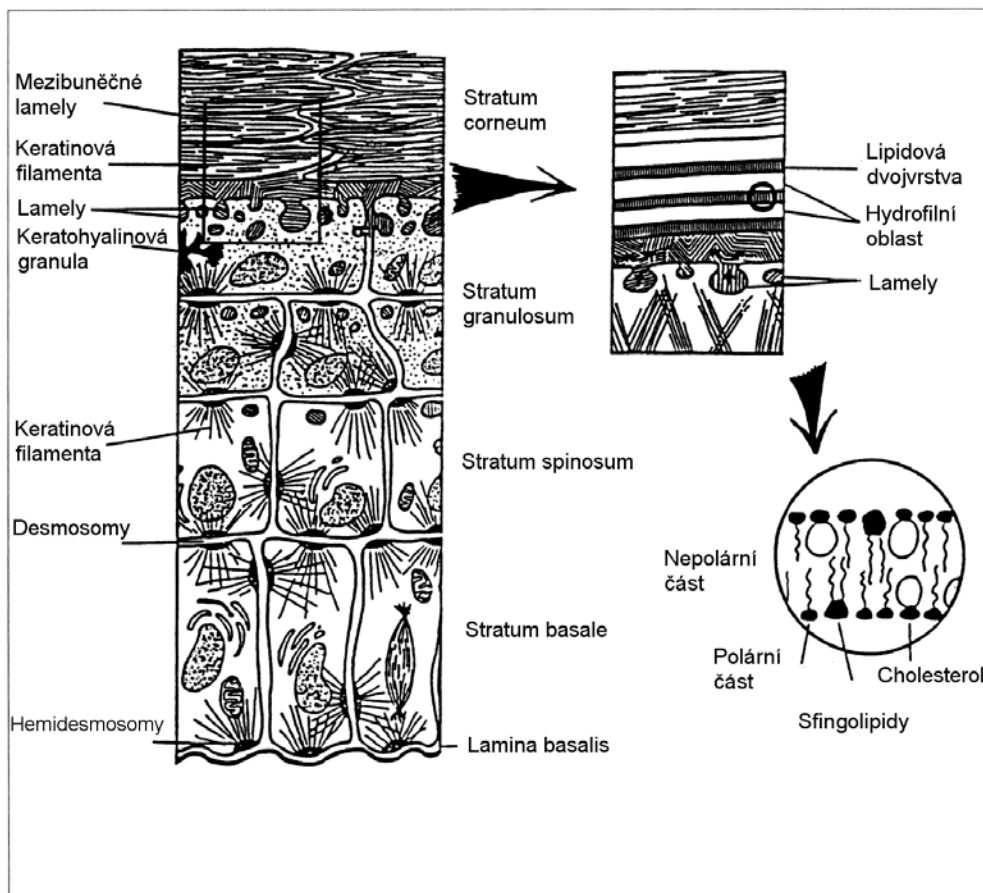
2. KŮŽE

Kůže jako zevní pokrývka těla je důležitý hraniční orgán, který organismu zajišťuje ochranu před vlivy vnějšího prostředí, a to jak fyzikálními, tak chemickými.

Kůže je největším orgánem lidského těla. Kožní povrch představuje plochu až 2 m², u dospělého člověka váží okolo 15 kg, což odpovídá přibližně jedné pětině jedné pětině tělesné hmotnosti.

2.1. Stavba kůže

Kůže se skládá ze tří základních částí: epidermis, dermis a tela subcutanea. Z hlediska vlivů zevního prostředí na pokožku je nejdůležitější součástí kůže epidermis. Jde o vrstevnatý dlaždicový epitel tvořený převážně epitelovými buňkami - keratinocyty. Skládá se z pěti vrstev, nejhluběji uložené stratum basale, následuje stratum spinosum, na ně navazuje stratum granulosum, dále stratum lucidum a nejsvrchnější vrstva je stratum corneum (obr. č.1) (De Polo, 1998).



Obrázek č.1: Schéma epidermis (převzato z De Polo, 1998)

Stratum basale je základní vrstva epidermis, která se skládá z jedné řady palisádovitě uspořádaných cylindrických keratinocytů s velkými jádry a relativně malým množstvím cytoplasmy, které jsou přisedlé k lamina basalis. Ta tvoří rozhraní mezi epidermis a korielem. Keratinocyty jsou spojeny mezi sebou i s lamina basalis prostřednictvím desmosomů, ke kterým se v cytoplasmě upínají tonofilamenta. Z lamina basalis se keratinocyty uvolňují, postupně se mění a posouvají ke kožnímu povrchu, kde již jako bezjaderné korneocyty vytvářejí rohovou vrstvu. Dále jsou ve stratum basale přítomny melanocyty, Merkelovy buňky a Langerhansovy buňky.

Stratum spinosum je tvořeno více vrstvami keratinocytů nepravidelného tvaru, které mají ve vyšších vrstvách oploštělý tvar.

Stratum granulosum je tvořeno jednou až více vrstvami oploštělých keratinocytů, jejichž cytoplasma obsahuje keratohyalinová granula jako prekurzor keratinu.

Stratum lucidum je tvořeno keratinocyty, které ztrácejí jádro i organely, keratohyalinová granula se mění na keratin.

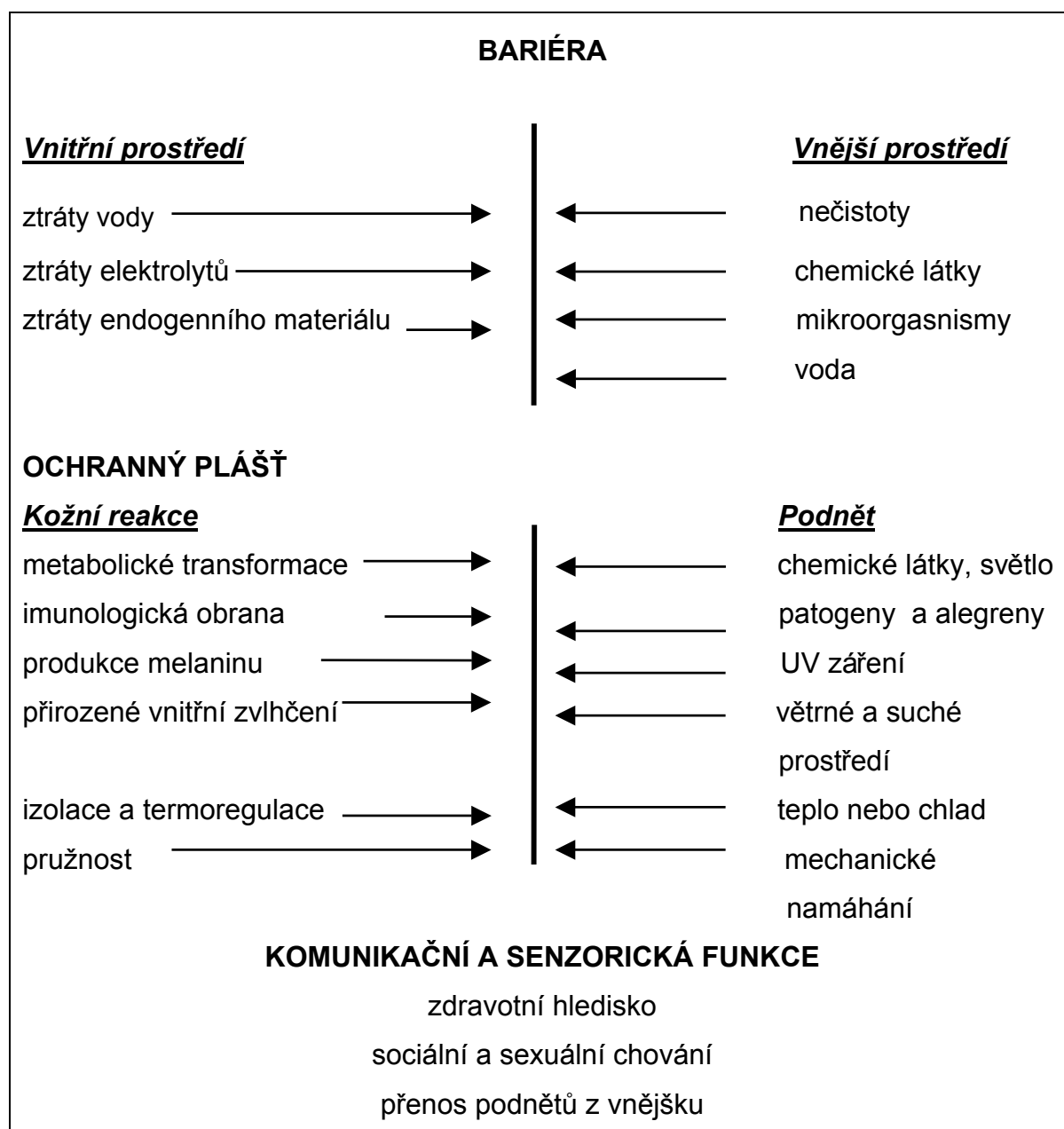
Stratum corneum je nejsvrchnější vrstva epidermis. Je tvořená přibližně 20 vrstvami bezjaderných, extrémně plochých a hustě na sebe kladených keratinizovaných buněk - korneocytů. Keratin je chemicky i mechanicky odolná bílkovina s disulfidovými vazbami, díky kterým je keratin pevný a pružný. Korneocyty se na povrchu odlupují v podobě jemných šupinek.

Stratum corneum je vrstva epidermis zodpovědná za bariérovou funkci kůže. Korneocyty a mezibuněčná hmota tvoří strukturu nazývanou "cihly a malta", přičemž korneocyty představují "cihly" a lipidová matrix v mezibuněčných prostorech představuje "maltu". Chemické složení stratum corneum má vliv na jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, a tím i na kvalitu kožní bariéry.

Stratum corneum je složeno ze 75 - 80% proteinů, 5 - 15% lipidů, rovněž jsou zde přítomny další organické sloučeniny a voda. Mezibuněčný prostor stratum corneum je vyplněn směsí specifických lipidů s malým množstvím vody. Lipidy jsou uspořádány do několika dvojevrstev tak, že jejich hydrofobní část směřuje dovnitř a hydrofilní část vně, do vodného prostředí. Lamely jsou tvořeny přibližně z 50% ceramidy, 25% cholesterolem, 10% volnými mastnými kyselinami, zbytek je tvořen organickými estery cholesterolu, cholesterol sulfátem a glukosylceramidy (Hrabálek a Vávrová, 2005). Obměna epidermis je jednou ze základních biologických funkcí kůže, probíhá kontinuálně a trvá přibližně 28 dní.

2.2. Fyziologie kůže

Fyziologické funkce kůže souvisí s její anatomickou strukturou a postavením kůže jako hraničního orgánu mezi organismem a vnějším prostředím. Z toho hlediska se jeví jako nejdůležitější bariérová (ochranná) funkce kůže. Ochranná funkce spočívá jak v omezení vstupu látek do hlubších vrstev pokožky, tak v regulaci ztrát vody, elektrolytů a dalších látek z organismu pryč (obr.č.2) (De Polo, 1998).



Obrázek č.2: Bariérová funkce kůže (převzato z De Polo, 1998)

Vrstvou kůže, která především odpovídá za bariérovou funkci, je epidermis přicházející jako první do přímého kontaktu s klimatickými faktory vnějšího prostředí, s látkami chemické i biologické povahy. Narušení epidermální bariéry může usnadnit průnik iritantů, alergenů, mikrobů a jiných nox vnějšího prostředí do epidermis. Jde o systém tvořený korneocyty a extracelulární lipidovou matrix. Korneocyty jsou mezi sebou spojeny pomocí korneodesmosomů, které poskytují stratum corneum pevnost a schopnost odolávat posuvným silám (Litvik, 2008).

Ochrannou funkci kůže lze rozdělit na fyzikální, chemickou a biologickou bariéru.

Fyzikální bariéra - mechanickou ochranu ve smyslu pevnosti a pružnosti zajišťuje dobře hydratovaná a promaštěná rohová vrstva (stratum corneum) spolu s desmosomy keratinocytů, sítí kolagenových vláken a podkožní tukovou tkání. Na fotoprotektivní funkci (ochrana před ultrafialovým zářením) se podílí rohová vrstva, keratohyalinové struktury stratum granulosum, obsah melaninu, aminokyselin, nukleových kyselin, beta-karotenu a hemoglobinu.

Chemická bariéra - je zajišťována ochranným filmem, který svým složením a kyselou reakcí vytváří účinnou bariéru proti chemickým látkám.

Biologická bariéra - neporušená rohová vrstva spolu s kyselým pH ochranného kožního filmu a rezidentní kožní flórou je překážkou proti nežádoucí mikrobiální kolonizaci kožního povrchu.

Přehnané používání kosmetických a čisticích prostředků s obsahem detergentů vede k porušení vlastního kožního filmu, narušení rohové vrstvy a ztrátě ochranné funkce kůže.

Mezi další, neméně důležité funkce, patří funkce sekreční. V kůži je produkován keratin, melanin, ekrinními žlázami pot a mazovými žlázami maz. Kůže se jako semipermeabilní membrána podílí na termoregulaci změnami prokrvení, pocením a odpařováním vody. V epidermis rovněž dochází k přeměně provitaminů na vitamin D vlivem UV záření. Velmi důležitá je imunologická funkce, kůže je nejspíše senzibilizovatelným orgánem, nacházejí se zde například Langerhansovy buňky, které se podílejí na procesu senzibilizace u kontaktního alergického ekzému (Novotný et al., 1989). Neméně významná je i depotní funkce. Kůže je významným rezervoárem vody vázané na kolagenní vlákna a jsou zde zásoby podkožního tuku. Kůže zprostředkovává organismu informace o zevním i vnitřním prostředí

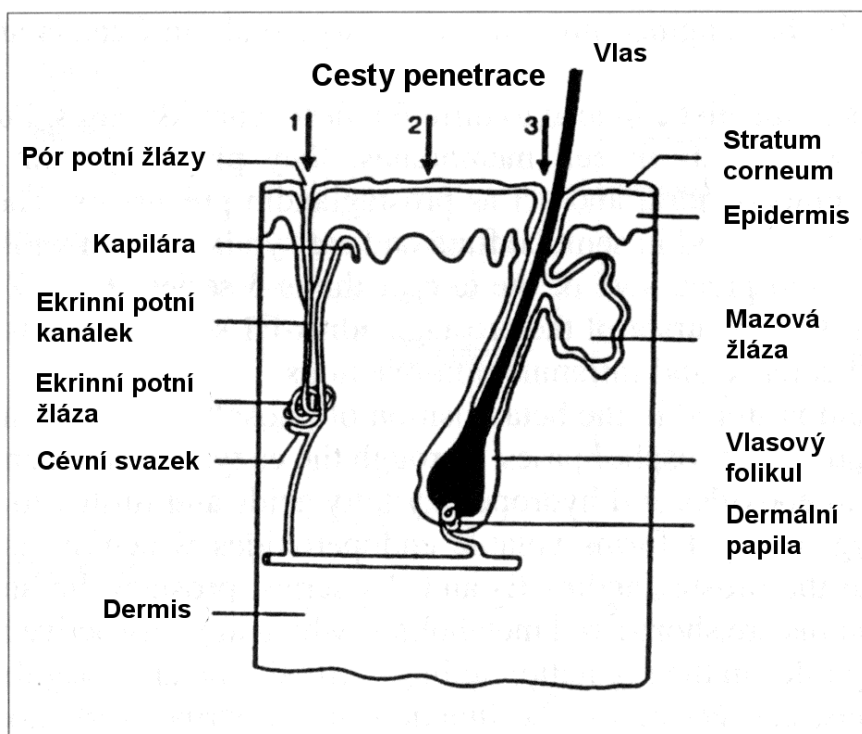
prostřednictvím receptorů, které registrují teplo, chlad, dotyk, tlak, bolest a další. Kůže se rovněž účastní nonverbální komunikace. Vzhled jedince souvisí s aktuálním stavem kůže, její fyziologické změny ve smyslu stárnutí případně při výskytu patofyziologických kožních projevů, je důležitým faktorem ovlivňujícím chování jedince a úzce souvisí s profesním a společenským úspěchem (Arenberger a Obstová, 2001).

2.3. Penetrace látek kůží

Jednou z nejdůležitějších funkcí kůže je zabránit penetraci nox vnějšího prostředí do organismu. Průnik většiny látek aplikovaných přímo na kůži je zanedbatelný, případně velmi malý. Současné výzkumy ukazují, že bariéra bránící průniku látek do kůže není na kožním povrchu, ale je lokalizovaná v rohové vrstvě.

2.3.1. Makro cesty penetrace

Vlasové folikuly (spolu s mazovými a apokrinními žlázami) a ekrinní žlázy představují "makro cesty" pro průnik látek kůží (obr.č. 3).



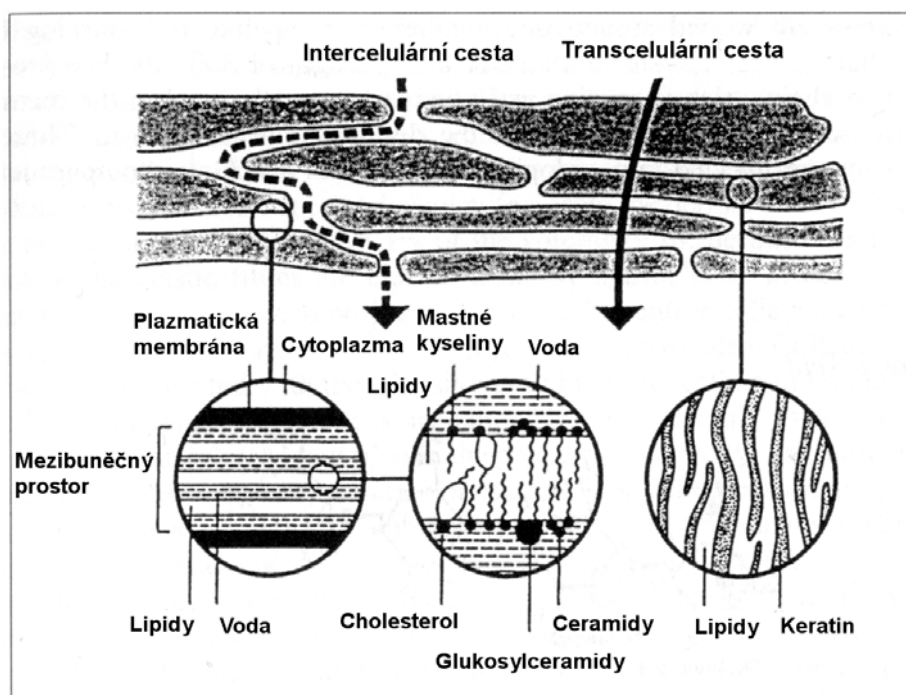
Obrázek č. 3: Makro cesty penetrace (převzato z De Polo, 1998):

1) přes potní žlázy; 2) přes neporušenou rohovou vrstvu; 3) přes vlasový folikul

Potní žlázy nejsou pravděpodobně nejdůležitější cestou penetrace, protože dlaně a chodila, které obsahují velké množství potních žláz, jsou poměrově velmi malou částí lidského těla. Přes možnost resorpce látek vlasovými folikuly v oblastech s vysokým výskytem vlasů / chlupů na těle, jsou makro cesty penetrace zanedbatelné vzhledem k tzv. "mikro" cestám průniku.

2.3.2. Mikro cesty penetrace

Bariérou pro perkutánní absorpci je celá rohová vrstva. Stripování vrstev epidermis adhesivní páskou vede k progresivnímu zvýšení propustnosti kůže. Izolovaná epidermis je stejně nepropustná jako celá kůže, zatímco samotná dermis je kompletně propustná. Mezibuněčné a buněčné cesty průniku jsou nazývány "mikro" cestami penetrace (obr.č. 4).



Obrázek č. 4: Mikro cesty penetrace (převzato z De Polo, 1998)

Penetrace kompaktními, keratinem vyplněnými kornecy v neporušené rohové vrstvě, je málo pravděpodobná, zatímco průnik látek mezibuněčnou cestou je možný. Kosmetické prostředky slouží k péči o pokožku a kožní povrch je cílovým místem pro jejich aplikaci a účinnost. Kožní penetrace některých ingrediencí (např. UV filtrů) je nežádoucí (De Polo, 1998).

3. FYZIKÁLNÍ FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ

Fyzikální faktory ovlivňující organismus prostřednictvím kůže jsou teplo, chlad, vlhkost prostředí, vítr, voda a zejména sluneční záření. Vlivy vnějšího prostředí se samostatně uplatňují pouze zřídka, zpravidla jde o kumulativní expozici jednomu nebo více klimatickým iritantům, které mají často synergický účinek.

3.2. Teplo, chlad, vlhkost prostředí, vítr, voda

Kombinace nízké vlhkosti ovzduší, vysoké teploty a rychlého pohybu vzduchu způsobují změny ve struktuře stratum corneum. Nízká vlhkost způsobuje dehydrataci a zároveň vede ke snížení obsahu aminokyselin a ke změně biosyntézy lipidů. Prodloužený a opakovaný kontakt s vodou má za následek pokles korneocytů, rozštěpení mezibuněčných lamelárních dvojvrstev. Teplota mezi 37 - 40°C má vliv na strukturální změny epidermálních lamelárních lipidů - ceramidů. Toto vše jsou faktory, které vedou ke snížení funkce ochranné bariéry a zvyšující prostupnost stratum corneum pro iritanty, alergeny a další noxy zevního prostředí (Schliemann a Elsner, 2007).

3.3 Sluneční záření

Nejdůležitější fyzikální faktor vnějšího prostředí ovlivňující organismus, jak v pozitivním, tak v negativním smyslu, je sluneční záření. Záření slunce, které dopadá na zemský povrch, je druhem elektromagnetické radiace. Může být tedy absorbováno, rozptylováno, odraženo nebo lámáno. Sluneční spektrum v ultrafialové a viditelné oblasti je uvedeno v obr. č. 5.

UVC	UVB	UVA	viditelné záření	infračervené záření
100 - 290 nm	290 - 320 nm	320 - 400 nm	400 - 700 nm	nad 700 nm

Obrázek č. 5: Sluneční spektrum v ultrafialové a viditelné oblasti

Záření kratších vlnových délek než 290 nm (některé zdroje uvádějí 280 nm) označované jako UVC záření a část UVB záření je odfiltrováno ozonovou vrstvou v dolní části atmosféry a na zem neproniká. Ozonová vrstva je součástí stratosféry, ve výšce přibližně 20 - 30 km nad zemským povrchem. Novou skutečností s velkými důsledky pro celou oblast fotobiologie jsou změny klimatu doprovázené redukcí ozonové vrstvy. Od poloviny 70. let dochází v jarních a podzimních měsících k výraznému poklesu celkového ozonu nad Antarktidou. Oblast poklesu dosahuje až 20 milionů km².

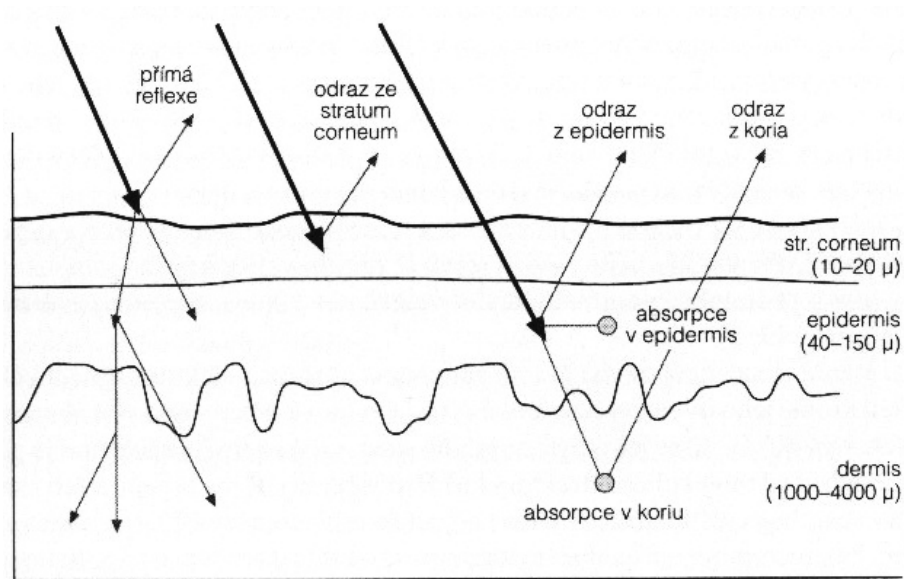
Většinu biologických účinků vykazuje část záření v oblasti vlnových délek 290 - 800 nm. Jako UVB, tedy středněvlnné ultrafialové záření, je označována oblast mezi 290 - 320 nm. Jde o energeticky bohaté záření způsobující krátkodobé i dlouhodobé poškození kůže.

Oblast mezi 320 - 400 nm je definována jako UVA - dlouhovlnné ultrafialové záření. Je to energeticky méně bohaté záření a jeho fotobiologický efekt je dlouhodobý, kumulativní. UVA složka záření je zodpovědná za fototoxické / fotoalergické reakce.

Pásmo mezi 400 - 700 nm je označováno jako viditelné světlo. Záření v pásmu nad 700 nm je označováno jako infračervené a má výrazné tepelné účinky (De Polo, 1998).

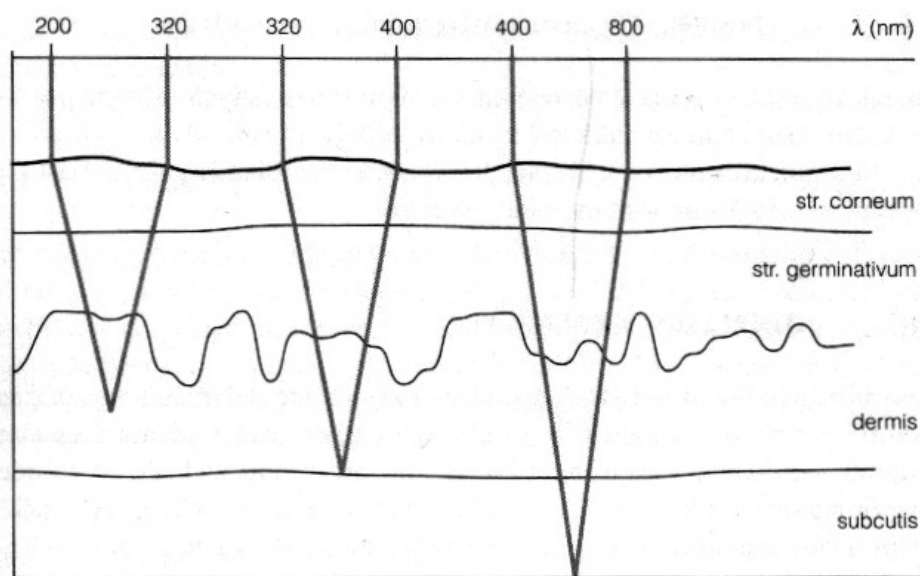
Sluneční radiace dopadající na zemský povrch se skládá z přibližně 50% viditelného spektra, 5% ultrafialového záření a zbytek připadá na infračervené pásmo. Na dopad slunečního záření na zemský povrch včetně poměrů UV záření, viditelného světla a infračerveného záření má vliv řada faktorů. Mezi hlavní faktory patří denní doba, roční období, zeměpisná šířka, přítomnost mraků, znečištění ovzduší a nadmořská výška. Velký význam má odraz UVB radiace od různých povrchů.

Vzhledem k tomu, že světelné záření je elektromagnetická radiace, dochází i při průchodu kůží k jeho lomení, odrazu a absorpci (obr. č.6) (Malina, 1999).



Obrázek č.6: Šíření světla v kůži (převzato z Malina, 1999)

Záření prochází kůží, přičemž hloubka penetrace je přímo úměrná jeho vlnové délce. Středněvlnné UVB záření prochází maximálně do dermálních papil, dlouhovlnné UVA záření se dostává na rozhraní koria a podkoží a viditelná složka slunečního záření prochází až do podkoží (obr.č.7) (Malina, 1999).



Obrázek č.7: Závislost hloubky průniku světla do kůže na vlnové délce (převzato z Malina, 1999)

Chemické změny vyvolané působením molekul aktivovaných zářením postihují v kůži zejména nukleové kyseliny, bílkoviny, steroidy a jejich prekurzory, dále melanin, urokanovou kyselinu, porfyriny a v menší míře i některé další endogenně vznikající sloučeniny, např. vitaminy.

3.4. Účinky ultrafialového záření na kůži

Účinky na kůži vyvolané UV zářením lze rozdělit na dva druhy, a to časné a pozdní. Mezi první patří radiačně podmíněný zánět, opálení, imunologické změny, hyperplazie a syntéza vitamínu D. K pozdním účinkům se řadí stárnutí kůže a fotokarcinogeneze.

3.4.1. Časný typ účinků

Radiačně podmíněný zánět

Radiačně podmíněný zánět je navozen převážně UVB složkou záření s vlnovou délkou okolo 300 nm. Absorpcí UV záření bílkovinami a DNA kožních buněk vzniká molekulární a buněčné poškození spojené s poruchou tkáňových funkcí a je manifestováno zánětem. Příznaky zánětu jsou erytém, edém, pálení a bolest a objevují se v průběhu několika hodin, nejvýše dní. Toxická reakce může být zvýšena i fototoxickým mechanismem, tj. zvýšením citlivosti kůže v přítomnosti UV záření. Léky podávanými perorálně (např. tetracyklin, chlorpromazin, nesteroidní antirevmatika) nebo aplikované lokálně mohou způsobovat fototoxické/fotoalergické reakce. Další skupinou látek umocňující fototoxickou reakci jsou chemické látky (dehet, ropné látky), případně některé ingredience používané v kosmetických prostředcích (např. bergamotový olej, některé rostlinné extrakty, p-phenylendiamin) (Ettler, 2007).

Opálení

Časný typ opálení se objevuje zejména po expozici UVA složce záření. Jde o fotooxidativně zprostředkované ztmavnutí preformovaného melaninu a jeho přenos z melanocytů do keratinocytů. Pozdní typ opálení je trvalejší, dostavuje se až po několika dnech, případně týdnech, po expozici UVB i UVA složce záření. Podstatou je vytvoření nového melaninu v melanocytech a jeho transferu do keratinocytů.

Imunologické změny

Ultrafialové záření vyvolává již při nízkých dávkách poškození a ovlivnění funkce Langerhansových buněk. Indukují se místo nich jiné buňky kůže prezentující antigen a cirkulující antigen-specifické supresorové T-lymfocyty, což má za následek změnu charakteru procesů prezentace antigenů a zvýšení míry imunosuprese.

Hyperplazie kůže

Vlivem UVB složky záření dochází k urychlení syntézy DNA, RNA a bílkovin a k mnohonásobnému zvýšení mitotické aktivity keratinocytů. Epidermis a korium se ztlušávají až čtyřnásobně, čímž dochází k významnému růstu fotoprotektivní schopnosti kůže. Hyperplastické změny trvají i několik měsíců a výrazně se uplatňují zejména u osob se světlou pletí.

Syntéza vitamínu D

V epidermis dochází ke změně 7-dehydrocholesterolu na provitamin D₃, který je následně transportován do oběhu a navázán na specifické proteiny. Za syntézu vitamínu D odpovídá UVB záření o vlnové délce 295 - 315 nm, které je rovněž zodpovědné za vyvolání radiačně podmíněného zánětu. Pro syntézu vitamínu D stačí v letních měsících expozice slunečnímu záření na oblast obličeje a rukou 15 minut třikrát týdně (Giacomoni, 2007).

3.4.2. Pozdní typ účinků

Stárnutí kůže - photoageing

Vlivem kumulujícího se poškození DNA vyvolávaného opakovanou expozicí jak slunci, tak umělým zářičům, dochází k postupnému vzniku vrásek, suchosti a zhrubnutí kůže, žloutnutí, hyperpigmentaci a ochabování kožního turgoru. Epidermis je poškozována převážně UVB složkou záření a poškození dermis nastává jak po UVB, tak po UVA radiaci.

Fotokarcinogeneze

Na vzniku aktinických keratóz a nemelanomových zhoubných kožních nádorů, bazaliomu a spinaliomu se podílí především UVB složka záření. Zodpovídají za to patrně změny DNA spočívající v chybné opravě jejího poškození vlivem záření, spolu s poruchou imunitních funkcí (Malina, 1999).

3.4.3. Fototoxicita

UV záření může v kombinaci s určitými látkami aplikovanými jak perorálně, tak lokálně, vyvolávat fotoalergickou / fototoxickou / fotogenotoxickou reakci. Podle mechanismů způsobujících poškození organismu je definován příslušný typ reakce.

Fotosenzibilizace je proces, při němž jsou vyvolány nežádoucí reakce kůže na jinak běžně neúčinné dávky záření vlivem přítomnosti specifické látky - fotosenzitizéru, absorbujícího záření specifické vlnové délky. Fotosenzibilizace může být vyvolána řadou látek, které přicházejí do kontaktu s organismem při perorální aplikaci, inhalaci, případně topické aplikaci. Mezi látky způsobující fotosenzibilizaci patří léčiva, látky rostlinného původu a chemické látky, které jsou součástí předmětů běžného užívání (např. kosmetických prostředků), případně výrobků spotřební a domácí chemie (Spielmann et al., 1994).

Fototoxicita je proces, při němž dochází k toxické odezvě kůže na látku aplikovanou topicky po expozici světlu nebo vyvolanou ozářením kůže po systémovém podání látky (ES, 2008). Vznik fototoxické reakce závisí na dostatečné absorpci a distribuci látky v tkáních, přičemž fungující detoxifikace a vyloučení látky organismem snižuje fototoxický potenciál příslušné látky. Účinek většiny fotosenzitizérů je spuštěn vlivem UVA záření, existuje však i řada látek se specifickou reakcí na UVB záření nebo záření z oblasti viditelného spektra v případě barviv (Marzulli a Maibach, 1987).

Pro proces fotosenzibilizace je nezbytná absorpce fotonu UV/vis záření fotoaktivní molekulou. To vede ke vzniku nestabilního excitovaného stavu, tj. singletu nebo převažujícímu tripletu.

Fotochemické reakce jsou rozdělovány do dvou skupin, a to na fotochemickou reakci I typu, kdy senzitizer v tripletovém stavu předává svoji energii přímo biologickému substrátu a zároveň dochází k produkci volných radikálů reagujících s kyslíkem za vzniku superoxidovaného radikálu ($O_2^{\cdot-}$), (peroxidu vodíku (H_2O_2), hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}) a dalších reaktivních forem kyslíku (ROS). Fotochemická reakce typu II spočívá v energetickém transferu ze senzitizeru v tripletovém stavu na kyslík v základním stavu. Vzniká singletový kyslík, který je vysoce reaktivní a jeho oxidační účinek poškozuje membránové struktury a makromolekuly včetně nukleových kyselin, lipidů či proteinů.

Typ fotochemické reakce závisí na typu fotoaktivní látky, biologického substrátu (např. nukleová kyselina, protein, část membrány) a na reakčních podmínkách (např. pH, obsah kyslíku) (Spielmann et al., 1994).

Erytém, edém, vesikulace (tvorba puchýřků), svědění, zvýšená teplota kůže a přetrvávající hyperpigmentace jsou typické klinické projevy dermální fotoiritace. V průběhu zánětlivého procesu jsou uvolňovány histamin, kinin a deriváty kyseliny arachidonové, např. prostaglandiny (Marzulli a Maibach, 2004). První příznaky se objevují již během několika minut až hodin po ozáření a jsou doprovázeny následným olupováním a trvalejšími skvrnitými hyperpigmentacemi (Ditrichová, 2008).

Fototoxické reakce se objevují častěji než reakce fotoalergické. Fotoalergické reakce jsou obvykle výsledkem imunitní reakce IV. typu (pozdní buněčný typ) zprostředkované T-lymfocyty (Dubakiene a Kupriene, 2006). Fotoalergické reakce vznikají jen u predisponovaných osob po předchozí fázi senzibilizace (nejméně 1-2 týdny). Prakticky každá fototoxická látka může zapříčinit také fotoalergickou reakci. Mezi látky způsobující fotoalergické reakce se řadí topicky aplikovaná léčiva (např. lokální antiflogistika), vonné substance (parfémy obsahující éterické oleje), případně organické filtry na ochranu proti slunečnímu záření (např. benzofenony). Klinicky jsou fotoalergické reakce demonstrovány ekzémovými projevy s papulovezikulózním výsevem, časté je neostré ohraničení vyrážky a její šíření i za hranice ozáření (Ditrichová, 2008).

Při narušení DNA nebo jiných buněčných struktur se objeví mutace a chromozomální aberace, které mohou vést ke vzniku nádorů (Loveday, 1996). Fotogenotoxicita a fotokarcinogenita některých látek souvisí se vznikem singletového kyslíku, volných radikálů a dalších reaktivních forem kyslíku. Řada látek používaných v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu má fotogenotoxický potenciál. Jedná se např. o psoraleny, fenothiaziny, fluorochinolony a další substance (Stern, 1998).

3.4.4. Hodnocení potenciálu fototoxicity

Součástí hodnocení bezpečnosti chemických látek a finálních výrobků, například kosmetických prostředků a léčiv před jejich uvedením na trh, je provedení toxikologických testů potvrzujících nepřítomnost nebezpečných vlastností včetně fototoxicity. Zkoušky fototoxicity jsou prováděny u látek, které absorbují energii

v oblasti slunečního záření. Vždy před zahájením vlastního testu je nezbytné stanovit UV/vis absorpční spektrum zkoušené látky podle metodického pokynu OECD. Pokud látka absorpci nevykazuje, zkoušení se neprovádí (OECD, 1981).

Pro zkoušení potenciálu fototoxicity byly využívány klasické metodické postupy na zvířatech nebo ve skupině dobrovolníků (Marzulli a Maibach, 2004; Kligman a Breit, 1968). V rámci těchto postupů byla navozená fototoxická reakce hodnocena na základě klinických symptomů. Zkoušky akutní fototoxicity in vivo na zvířatech nebyly vědecky potvrzeny ani validovány (Lovell a Sanders, 1992; Nilsson et al., 1993). V 90. letech minulého století Evropská komise reprezentovaná Generálním ředitelstvím (Directorate General XI) a později Evropským centrem pro validaci alternativních metod (ECVAM) společně s Asociací výrobců kosmetiky (COLIPA) zorganizovala rozsáhlou studii pro vývoj a validaci zkoušek fototoxicity in vitro.

Úspěšnou validací prošla zkouška fototoxicity využívající buněčné linie myších fibroblastů Balb/c 3T3 (Spielmann et al., 1994; 1998). V roce 2000 se v členských státech EU stala tato zkouška jakožto první alternativní metoda součástí právního řádu (ES, 2008) a v roce 2004 byla přijata jako metodický pokyn OECD (OECD, 2004).

Principem zkoušky je vyhodnocení fototoxicity z relativního snížení životaschopnosti buněk, myších fibroblastů linie Balb/c, exponovaných zkoušené látce v přítomnosti světla oproti buňkám, které nebyly radiaci vystaveny. Cytotoxicita je vyjádřena jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva (neutrální červeně, NR) 24 hodin po působení zkoušené látky a ozáření (Babich a Borenfreund, 1990). NR je slabé kationické barvivo, které nedifuzně proniká buněčnými membránami a akumuluje se v buněčných lysosomech. Změny povrchu citlivých lysosomálních membrán, vyvolané působením xenobiotik, způsobují ztrátu pevnosti lysosomů a další nevratné změny, které vedou ke snížení příjmu a vazby neutrální červeně. Je proto možné rozlišovat mezi životaschopnými, poškozenými nebo mrtvými buňkami (ES, 2008; OECD, 2004).

Tato zkouška je vysoce citlivá, je tedy považována za spolehlivou základní metodu pro identifikaci akutních fototoxických účinků u člověka. Pokud je dosažený výsledek zkoušky negativní, další zkoušení není prováděno. Nevýhody a omezení této metody jsou v poslední době často diskutovány (Spielmann et al., 2000).

Zkouška fototoxicity in vitro prováděná na monolayeru myších fibroblastů je velmi jednoduchý a citlivý biologický systém ve srovnání s trojrozměrnou stavbou lidské kůže, která zahrnuje spojení a interakce různých typů buněk a má ochrannou bariéru ve formě stratum corneum. Omezení zkoušky 3T3 NRU jsou poměrně velká. Touto metodou nelze testovat směsi či látky ve vodě nerozpustné či s extrémní hodnotou pH. Rovněž citlivost buněk v monolayeru je navíc vysoká a vede k řadě falešně pozitivních výsledků především ve vyšších koncentracích látek. Je prokázáno, že přestože je výsledek zkoušky 3T3 NRU PT pozitivní, zkoušená látka může být v některých případech aplikována bezpečně na kůži. Předpokladem je, že látka není významně absorbována a nepenetruje do hlubších vrstev epidermis (Jones et al., 2003; Kandárová, 2006).

Doplňkovou metodou zavedenou pro zkoušení látek aplikovaných na kůži a podrobenou prevalidačnímu procesu je zkouška fototoxicity využívající modely rekonstruované lidské epidermis (Liebsch et al., 1999). Narozdíl od zkoušky fototoxicity 3T3 NRU umožňuje tato metoda, která je založená na trojrozměrných kožních modelech s funkční rohovou vrstvou, odhadnout riziko dle absorpce / penetrace látky a tudíž její biologickou dostupnost v hlubších vrstvách kůže (Spielmann et al., 2000). Modely rekonstruované lidské kůže umožňují zkoušení přípravků a látek, aplikovaných topicky, a to bez ředění, včetně látek s extrémním pH či zapracované ve formulacích v nízkých koncentracích jako v konečném spotřebitelském výrobku (Liebsch et al., 2005).

Zkouška fototoxicity na trojrozměrných modelech kůže byla zařazena mezi validní alternativní metody do databáze ECVAM jako INVITTOX protokol č. 121. (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>).

4. CHEMICKÉ FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ

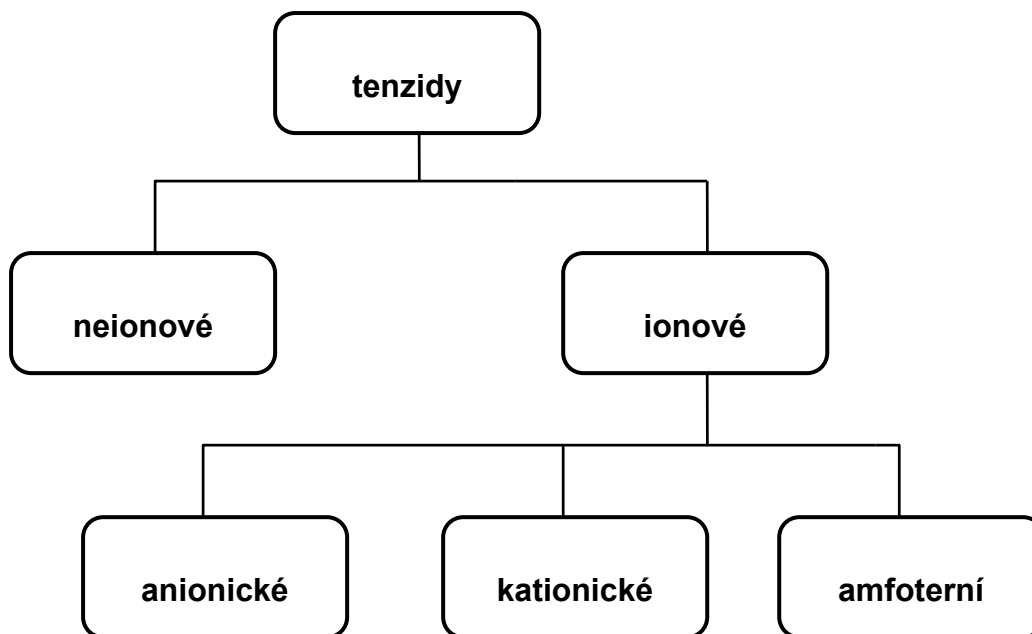
Zátěž organismu chemickými faktory vnějšího prostředí pochází z různých zdrojů. Jedním z těchto zdrojů je znečištěné životní prostředí včetně ovzduší. Toto znečištění se uplatňuje zejména v kombinaci s fyzikálními faktory, jako je chlad, teplo, vítr, vlhkost vzduchu. Významným zdrojem chemických látek, které přicházejí do přímého kontaktu s organismem prostřednictvím kůže, jsou prostředky domácí a bytové chemie a kosmetické prostředky. Řada látek používaných v těchto typech výrobků je klasifikována jako iritanty. Do výrobků jsou však zapracovávány v koncentracích, které nebezpečí iritačního potenciálu nemají.

4.1. Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (PAL) - tenzidy - je skupina ingrediencí, které se používají téměř ve všech typech kosmetických prostředků. PAL je skupinové označení látek, které výrazně ovlivňují energetické poměry na rozhraní dvou fází. To se projevuje snížením mezifázového napětí. Tyto specifické vlastnosti jsou dány chemickou a fyzikální strukturou jejich molekul. Molekula se skládá z ohraničené hydrofilní a hydrofobní části. Chování PAL v roztoku závisí na velikosti obou částí. V polárním rozpouštědle (voda) se hydrofobní část snaží zaujmout takové uskupení, které co nejvíce omezuje jeho styk s rozpouštědlem. Dochází k tvorbě nekovalentních interakcí. Hydrofilní část má naopak vysokou afinitu k vodě, což napomáhá orientaci molekul PAL v rozpouštědle. Povrchové napětí je vytvářeno přitažlivými silami mezi molekulami.

Detergent je směs tenzidů a dalších látek, která má detergenční vlastnosti, což je schopnost převádět nečistoty z pevného povrchu do objemové fáze roztoku.

Podle ionicity dělíme tenzidy do skupin podle následujícího schématu (obr. č.8)



Obrázek č. 8: Dělení tenzidů (převzato z [http:// utb.cepac.cz/](http://utb.cepac.cz/))

Neionové tenzidy

Hydrofilní část těchto tenzidů není schopna disociace. Na její polaritě závisí, je-li daný tenzid rozpustný ve vodě nebo olejové fázi. Patří sem alkyl polyoxyetylenetery, estery mastných kyselin, monoacylglyceroly a jejich deriváty, substituované etery sacharidů.

Ionové tenzidy

Polární skupiny těchto tenzidů jsou disociovatelné. Účinnou složkou je buďto aniont nebo kationt. Amfoterní tenzidy se mohou chovat jako anionické nebo kationické v závislosti na podmínkách.

Anionické tenzidy

Jsou klasifikovány podle druhu disociovatelné skupiny. Hydrofilní částí molekuly jsou nejčastěji nasycené alkyly s 8-18 atomy uhlíku. Do této skupiny patří mýdla, alkylfosfáty, alkylsulfáty, alkylsulfonáty, dialkyljantaráty. Tento typ tenzidů se používá pro výrobu kapalných i práškových mycích, pracích prostředků a smáčecích prostředků.

Kationické tenzidy

Mezi kationické tenzidy patří primární, sekundární, terciární a kvarterní aminy. Kvarterní aminy s délkou řetězce 8-18 uhlíků jsou nejrozšířenější. Tyto tenzidy jsou používány v avivážích a ve vlasových kondicionérech.

Amfoterické tenzidy

Amfoterické tenzidy obsahují v nedisociovatelné části molekuly jak anion, tak kation. Tím je dána jejich unikátní vlastnost, a to možnost kombinovat je v recepturách s kationickými i anionickými tenzidy. Jedním z nejpoužívanějších amfoterických tenzidů je betain. V kombinaci s alkylpolyglykolsulfátem tvoří základ téměř veškerých kosmetických mycích prostředků, tj. vlasových šamponů, sprchových mycích prostředků, tekutých mýdel i koupelových pěn. (<http://utb.cepac.cz/>; Šmidrkal, 1999).

Komerčně dostupných jsou stovky surfaktantů, ale jen malá část je vyráběna ve velkém množství. Většina tenzidů je komerčně dostupná jako směs chemických látek, ne jako čisté substance. Výrobci tenzidů připravují rámcové receptury na své směsi PAL pro různé účely použití v závislosti na druhu výrobku, způsobu a účelu použití vyvíjené formulace (Porter, 1994).

Působením povrchově aktivních látek na biologické membrány se zvyšuje jejich propustnost. Je to pravděpodobně způsobeno interakcí tenzidů s mezibuněčnými lipidovými dvojvrstvami, což vede k zvýšenému narušení v uspořádání lipidů. Surfaktanty mohou rovněž snížit teplotu celé vrstvy stratum corneum (Dunitz, 1992).

Jedním z nejběžnějších tenzidů je Laurylsíran sodný (SLS), který se používá jako modelový iritant pro jeho schopnost ovlivnit bariérovou funkci kůže a vyvolat zánětlivou reakci (Charbonnier et al., 1998). Poškození bariérové vrstvy je doprovázeno transepidermální ztrátou vody projevující se snížením hydratace kůže (Treffel a Gabard, 1996). SLS (20% vodný roztok) je v řadě studií doporučován a používán jako pozitivní kontrola vyvolávající reverzibilní iritační reakce (Basketter et al., 1997).

4.2. Esenciální oleje

Aromatické rostliny a nálevy z nich připravené jsou v lékařství a kosmetice používány tisíce let. Používání destilovaných esenciálních olejů je datováno do roku 1000 n.l., kdy byl vynalezen postup destilace v podobě, jak jej známe nyní. Pokud jsou oleje z rostlin destilovány, jejich koncentrace je i 100 krát větší, a proto jsou některé jejich vlastnosti zvýrazněny. Přírodní původ esenciálních olejů nezaručuje jejich bezpečnost. "Přírodní" není synonymum pro "bezpečný". Rizikovými oleji používanými jak v aromaterapii, tak v topicky aplikovaných výrobcích jsou například esenciální oleje z bazalky, z kůry skořicovníku a bergamotový olej. Riziko opakovaného používání těchto esenciálních olejů je v možnosti rozvoje alergické, případně fototoxické / fotoalergické reakce. Při aplikaci rizikových olejů je třeba brát v úvahu, že nesmí být aplikovány na poškozenou kůži nebo na místa s projevy podráždění. Dermatitida může být signálem, že kůže je náchylná k nežádoucím reakcím na esenciální oleje.

Esenciální oleje jsou těkavé, organické složky rostliny, které specificky ovlivňují její chuť a vůni, ale nejsou přítomny v celé rostlině. Jsou získávány z různých částí rostliny, a to z květů (růže), listů (pepermint), plodů (citron), semen (fenykl), kořenů a oddenků (křen, puškvorec), dřevních částí (cedr), kůry (skořice), sušených květních pupenů (hřebíček), květů stromů (ylang-ylang) a cibulí rostlin (česnek) (Tisserand a Balacs, 1995).

Esenciální oleje jsou zpravidla kapaliny, ale některé existují při pokojové teplotě ve formě pevné nebo polotuhé látky.

Většina esenciálních olejů je z rostlin získávána parní destilací. Rostlinným materiálem v čerstvém nebo sušeném stavu je proháněna pára, esenciální olej a voda jsou z rostliny uvolněny, následně jsou pak jímány a chlazeny. Tato metoda je vhodná pro rostlinné materiály obsahující složky silic s vysokým bodem varu. Výsledkem je esenciální olej - směs vonných složek. Občas je zbarvený a jsou v něm přítomny biologicky aktivní látky.

Další metodou používanou při výrobě esenciálních olejů je vodní destilace. Rostlinný materiál je ponořen do vody a podroben varu. Olejová pára je kondenzována a olej je od vody separován. Tato metoda se používá při výrobě éterických olejů získávaných z květů, případně z rostlinného materiálu ve formě prášku.

Esenciální oleje mohou být rovněž extrahovány pomocí různých typů rozpouštědel. Tato metoda je používána v případě, pokud by vonné vlastnosti rostlin mohly být změněny nebo zničeny parní nebo vodní destilací, případně tehdy, když rostlina, například růže nebo jasmín, obsahuje velmi málo olejů. Extrakcí rozpouštědlem jsou získávány extrakty "concrete" a "absolut". Extrakt "concrete" obsahuje kromě esenciálního oleje i mastné kyseliny a vosky, tedy balastní látky. Po vyčištění od balastních látek druhou destilací je získaný čistý extrakt označovaný jako "absolut".

Pro extrakci esenciálních olejů pomocí superkritické CO₂ extrakce je používán extrémně vysoký tlak, jehož vlivem se CO₂ mění na kapalinu a extrahuje esenciální olej z rostliny. Když je tlak opět snížen, CO₂ se vrací do plynného stavu. Mnoho extraktů získaných pomocí superkritické CO₂ extrakce má čerstvější, čistější a jiskřivější aroma než esenciální oleje získané parní destilací a vůně se podobá vůni živých rostlin. Řada studií uvádí, že extrakcí CO₂ jsou získávány esenciální oleje, které jsou velmi účinné a mají značné terapeutické účinky. Tento postup používá nižší teplotu než parní destilace a je proto šetrnější (Wilson, 1995).

4.3. Fototoxicita rostlinných substancí

V rostlinných extraktech mohou být obsaženy substance vyvolávající kožní reakce tzv. fytofotodermatózy. Těmito substancemi jsou zejména přírodní heterocyklické sloučeniny furokumariny (psoraleny), které mají kumarinovou strukturu navázanou na furanové jádro (Tisserand a Balacs, 1995). Mezi nejrozšířenější furokumariny patří psoralen, bergapten, xantotoxin nebo angelicin (Zhai a Maibach, 2004).

Typickým zástupcem rostlin obsahujících furokumariny jsou např. rostliny čeledi Umbelliferae (bolševník, andělíka, karotka, celer, petržel a další) a čeledi Rutaceae (citrusy, bergamot, routa a další), které kůži zcitlivují na záření nejen po kontaktu, ale i po perorálním použití. Velká pozornost je věnována esenciálním olejům, které mají výrazný fotosenzibilizační potenciál. Řada těchto olejů (bergamotový, levandulový, skořicový, citrónový nebo pomerančový) je součástí receptur kosmetických prostředků jako složky parfémových kompozic. Při topické aplikaci se mohou vlivem ozáření objevit kosmeticky rušivé, dlouhotrvající a k léčbě rezistentní přesuny pigmentu (Ditrichová, 2008).

Furokumariny se vyskytují s molekulou uspořádanou lineárně (např. psoraleny, isopimpinelin, citropten, oxypeucedin) nebo angulárně (např. angelicin, pimpinelin) a absorbují záření v rozsahu 300 - 335 nm.

Po ozáření molekula furokumarinu absorbuje foton a tím je nastartována fotodynamická reakce typu II. Poškození buněčných membrán, jader a enzymů je způsobeno singletovým kyslíkem vytvořeným fotodynamickou reakcí (Joshi a Pathak, 1983; Morliere et al., 1990). V případě bergaptenu bylo potvrzeno, že má fotogenotoxické i fotokarcinogenní účinky. V řadě studií je publikováno, že po opakované dermální aplikaci vyvolává u myši zvýšený výskyt karcinomů kůže (Averbeck et al., 1990; Young et al., 1990).

Řada rostlin a extraktů z rostlin s obsahem furokumarinů je v kosmetických prostředcích zakázána. Pakmín větší (Ammi majus) je zakázán jako rostlina včetně jejích galenických forem, fíkovník smokvoň (Ficus caria) je zakázán jako extrakt "absolut" z listů při použití jako složka parfémů, u verbeny citrónové (Lippia citriodora) je zakázán esenciální olej z ní, kromě "absolut" extraktu, který je v kosmetických prostředcích povolen do 0,2% ve finálním výrobku (vyhl. č. 448/2009 Sb.).

4.4. Iritální kontaktní dermatitida

Iritální kontaktní dermatitida je povrchové neinfekční zánětlivé onemocnění, u kterého se převážná většina změn odehrává v epidermis (Machovcová, 2006).

Pokud je expozice látkám, kterými mohou být i látky silně kyselé nebo zásadité povahy, dostatečná, objeví se klasické symptomy akutní kožní iritace. Kontakt se silným kožním iritantem je často náhodný. Akutní iritální dermatitida může být vyvolaná téměř u každého jedince v závislosti na přirozené vnímavosti. Po dosažení vrcholu iritální reakce a bezprostředně po ukončení kontaktu s iritantem začíná proces hojení. Pouze v neobvyklých případech iritální dermatitida může přetrvávat řadu měsíců po expozici.

Nástup a rozvoj iritální kontaktní dermatitidy závisí na charakteristice molekuly, době expozice, případně na kumulativním efektu s dalšími iritanty. Současně se uplatňují i podmínky vnějšího prostředí. V případě dostatečně vysoké expoziční dávky se mnoho chemických látek chová jako iritanty. Faktory důležité pro kožní penetraci, a tudíž i pro vznik kožní iritace, jsou velikost molekuly, ionizace,

polarizace, rozpustnost v tucích a další. Množství absorbované dávky se může měnit v závislosti na použitém rozpouštědle. Vliv na reakci má nejen rozpustnost iritantů v rozpouštědle, ale i potenciál iritace vlastního rozpouštědla. Účinná dávka závisí na koncentraci, objemu a aplikační době. Dlouhý expoziční čas a velký objem látky zvyšuje penetraci a může být tudíž očekávána i větší expozice iritantu. Pokud expozice probíhá opakovaně, regenerace z předchozí expozice a/nebo expozic ovlivňuje následující odezvu. Krátká opakující se expozice vede k prodloužení doby uzdravení (Zhai a Maibach, 2004).

Bylo popsáno několik cest patogeneze vzniku iritační dermatitidy. Iritační kontaktní dermatitida je reakce, která není podmíněná imunologickou reakcí, dochází při ní k uvolnění a aktivaci mediátorů zánětu a cytokinů, aniž by byly aktivovány T lymfocyty. Vzniká po vyčerpání přirozené obranyschopnosti kůže vůči chemickým látkám nebo poté, co se iritační látky vstřebají a vyvolají zánět. Iritační kontaktní dermatitida je lokalizována výhradně na místo expozice iritantu, může vzniknout po jediném kontaktu a projevuje se ostře ohraničeným erytémem kopírujícím oblast expozice, který může být doprovázený edémem, jasně červenými papulkami, případně subjektivně pálením a bolestivostí.

Chemické látky způsobují dráždivost nejméně dvěma různými cestami. První cestou je poškození bariérové funkce stratum corneum, druhou je účinek iritantů na kožní buňky.

Iritanty, které prostupují vrstvou stratum corneum mohou způsobovat denaturaci a delipidaci proteinů, čímž dochází k porušení rovnováhy poměru lipidů a ztrátě bariérové funkce. S tímto procesem souvisí zvýšení ztráty vody kůží a vede ke zvýšení průniku dalších iritantů do hlubších vrstev epidermis k živým keratinocytům.

Druhou cestou je dráždivý mechanismus spuštěný povrchově aktivními látkami (PAL) například laurylsíranem sodným (SLS). Po porušení buněčné membrány vlivem PAL, dochází k penetraci a vylití cytoplazmy z buňky. Cytoplazma keratinocytů všech vrstev epidermis obsahuje interleukin IL-1 α , což je hlavní cytokin indukující zánětlivou reakci. Uvolněný IL-1 α spouští aktivaci dalších interleukinů. Dále je aktivována fosfolipáza A₂, což je enzym hrající klíčovou roli při přeměně kyseliny arachidonové na další protizánětlivé cytokiny (prostaglandiny, thromboxany a leukotreiny).

Spuštění zánětlivé odpovědi nemusí být aktivováno pouze uvolněním IL-1 α , ale i jiným mechanismem než je poškození buněčné membrány. Iritanty mohou vyvolat i změny na buněčné úrovni uvnitř keratinocytů. Jednou z těchto změn je spuštění oxidativního stresu po podráždění. Keratinocyty kontinuálně produkují reaktivní formy kyslíku (ROS), které fungují jako sekundární přenašeč, regulují aktivitu fosforylačních proteinů a proteinkináz. Vysoké koncentrace ROS mohou rovněž způsobovat poškození nukleových kyselin, proteinů a membránových lipidů. ROS ovlivňují genovou expresi, což může vést až k cytotoxickým efektům a apoptóze buněk.

Každá látka, se kterou se setkáváme, může být za určitých podmínek iritantem. Mezi látky často vyvolávající iritační reakce patří například mýdla, detergenty, průmyslové čisticí prostředky, oleje, emulgátory, silikáty, různé aminy, kyseliny octová, salicylová, konzervační látky a v neposlední řadě i povrchově aktivní látky, éterické oleje a při dlouhodobé expozici může být iritantem i voda.

Mezi rizikové profese, které jsou náchylnější k výskytu iritační kontaktní dermatitidy, patří tzv. "mokrý profese" jako jsou kadeřníci, uklízečky, ale i personál ve zdravotnictví (Machovcová, 2008; Brůčková a Bílková, 2008).

4.5. Zkoušení kožní dráždivosti

Původní metodou používanou pro zkoušení potenciálu iritace u látek byl již od 40. let minulého století tzv. Draizův test využívající laboratorní zvířata, a to albinotické králíky. Tato zkouška je i nyní součástí metod hodnocení potenciálu dráždivosti in vivo u chemických látek (Nařízení Komise 440/2008, metoda B.4) a zdravotnických prostředků (ČSN EN ISO 10993-10) (ES, 2008a; CEN, 2002).

Přestože je tato zkouška stále součástí některých předepsaných metod, je dlouhodobě kritizována pro nízkou prediktivitu a omezenou relevanci výsledků pro člověka (Phillips et al., 1972; Nixon et al., 1975).

Tato zkouška poskytuje relevantní výsledky při klasifikaci silně dráždivých látek. V případě látek klasifikovaných jako lehce dráždivé jich řada nevyvolává u lidí žádné reakce. V některých studiích je uváděno, že až 40% látek, které pro člověka nejsou dráždivé, jsou jako dráždivé klasifikovány testem in vivo na králících (Basketter et al., 2004).

Společenské i ekonomické důvody vedly v poslední době k rozvoji a zavádění alternativních metod jako náhrad zkoušek na zvířatech. Velká pozornost byla soustředěna zejména na látky, které jsou primárně určeny pro kosmetický průmysl. Zásady zavedení alternativních metod pro zkoušení dráždivosti u ingrediencí kosmetických prostředků byly zahrnuty do tzv. 7. dodatku směrnice pro kosmetiku (EC, 2003). Později byly požadavky zkoušení potenciálu iritace včleněny i do legislativy chemických látek REACH, tedy do Nařízení týkající se registrace, hodnocení a autorizace chemických látek (EC, 2006).

Pro zkoušení potenciálu dráždivosti, leptavosti, penetrace a fototoxicity jsou v současné době využívány modely rekonstruované lidské kůže, které mají obdobné biochemické a fyziologické vlastnosti jako epidermis člověka. V současné době je dostupná řada kožních modelů od různých výrobců, například EPISKINTM a SkinEthic (L'Oréal, Francie), EpiDermTM (MatTek, USA), ESR-1000TM (Cell Systems GmbH, Německo) a PhenionTM (Phenion GmbH, Německo).

Na základě validačních studií pro zkoušku kožní leptavosti bylo prokázáno, že trojrozměrné modely kůže poskytují rovnocenné výsledky k výsledkům získaným pokusem na králících (Fentem et al., 1998; Liebsch et al., 2000). Na základě těchto studií jsou v pokynu OECD TG 431 definována kritéria kvality kožního modelu, aby mohl být předmětem validace (OECD, 2004a).

Jako další krok zahájil ECVAM v roce 2003 validační proces pro zkoušku kožní dráždivosti in vitro. Validace zahrnovala metodu funkční integrity kůže - SIFT-Skin Integrity Function Test (Heylings et al., 2003) a metody využívající rekonstruované kožní modely (model EpiDerm od firmy MatTek, USA, a model EPISKIN od firmy L'Oréal, Francie). Jako referenční údaje byly použity výsledky získané Draizovým testem, neboť až dosud byl tento test jedinou závaznou metodikou pro klasifikaci a značení chemických látek. Vzhledem ke skutečnosti, že při plánování validační studie a výběru sady chemických látek nebyla zohledněna data z humánní praxe, nebyly metodami in vitro některé vybrané látky klasifikovány shodně s údaji získanými v Draizově testu. Tím byla snížena i senzitivita a prediktivita, tj. vypovídací schopnost modelů (Spielmann et al., 2007).

U finálních výrobků, jako jsou i např. kosmetické prostředky, se ověřuje nepřítomnost potenciálu dráždivosti zejména metodou in vivo ve skupině dobrovolníků. Předpokladem pro provádění zkoušek ve skupině dobrovolníků je schválení postupů etickou komisí testovacího zařízení a podpis individuálního

informovaného souhlasu všemi probandy. Pro rutinní testování potenciálu iritace je doporučován 4 hodinový jednorázový test. Zkoušené materiály jsou aplikovány zpravidla v okluzi, těkavé látky by měly být vždy testovány za použití neokluzivních testovacích náplastí. Pro hodnocení nových receptur před uvedením výrobků na trh je používán kumulativní iritační test trvající 21 dní. Testovaný materiál je aplikován na horní část zad, případně vnější horní část paže, v okluzi na 24 hodin, testovací náplast je odstraněna, reakce je vyhodnocena a na stejné místo je opět aplikována zkoušená látka (Zhai a Maibach, 2004).

Hodnocení potenciálu iritace látek a materiálů ve skupině dobrovolníků je jednou z předepsaných metod pro zkoušení zdravotnických prostředků a je prováděno jako základní metoda při hodnocení bezpečnosti prototypů i finálních kosmetických prostředků (CEN, 2002; COLIPA, 1997).

5. AKTIVNÍ LÁTKY V KOSMETICKÝCH PROSTŘEDCÍCH

Do kosmetických prostředků jsou přidávány aktivní látky, které slouží k ochraně organismu, podílí se na zlepšení stavu kůže včetně obnovy a ochrany kožní bariéry a mají ochranný účinek proti dalším, potenciálně nepříznivým, ingrediencím v receptuře.

První skupinou ingrediencí jsou látky používané na ochranu před škodlivými účinky ultrafialového záření - UV filtry. Používání UV filtrů do kosmetických prostředků je v zemích Evropského společenství regulováno. Evropská směrnice pro kosmetické prostředky je transponována do českého právního řádu (vyhl.č. 448/2009, Sb., Příloha VII) a v současné době povoluje použití 27 látek jako UV filtrů. Látky uvedené na seznamu povolených UV filtrů jsou předmětem aplikace přísných toxikologických kritérií a vyhodnocení bezpečnosti (SCCNFP/0690/03). V prostředcích ke slunění jsou přítomny i jiné substance, které omezují vznik erytému (zarudnutí), např. extrakty některých rostlin. Ochranný mechanismus je vysvětlován protizánětlivým účinkem s inhibicí navození erytému v časně fázi solárního zánětu nebo inaktivací volných radikálů a inhibicí vzniku fototoxické reakce manifestující se na kůži erytémem (Sayre, 1993).

Další skupinou aktivních látek používaných v kosmetických prostředcích jsou ingredience s hydratačními účinky. Do receptur kosmetických prostředků jsou nejčastěji zapracovávány ingredience syntetické (chemické), např. glycerin, cyklomethikon, kyselina mléčná, propylen glykol, kyselina hyauronová, atd. Nejpoužívanější látkou s hydratačním účinkem rostlinného původu je aloe vera, ať už ve formě extraktu z listů, juice z listů, prášku získaného ze sušených listů anebo vodného roztoku získaného parní destilací listů.

Látky přidávané do receptur kosmetických prostředků za účelem snížení možného potenciálu iritace a protizánětlivých účinků jsou zejména rostlinného původu. Ingredience na bázi extraktů z aloe barbadensis, camellia sinensis, chamomilla recutita a dalších rostlin snižují iritační potenciál tenzidů a jsou přidávány do receptur výrobků na bázi tenzidů, např. sprchových gelů, tekutých mýdel, pěn do koupele a podobně. Různé typy extraktů z aloe barbadensis jsou

přidávány do emulzních výrobků používaných zejména jako prostředky k péči o kůži po slunění.

5.1. Filtry ultrafialového záření

Filtry ultrafialového záření jsou ingredience přidávané nejen do prostředků ke slunění, ale i do výrobků pro běžné denní použití, jako jsou make-upy, denní pleťové krémy, rtěnky, případně balzámy na rty.

5.1.1. Vlastnosti UV filtrů

Současné prostředky ke slunění poskytují širokospektrální UV ochranu a v receptuře obsahují kombinaci více UV filtrů. Moderní UV filtry by měly být fotostabilní, voděodolné, netoxické a snadno zapracovatelné do formulací kosmetických prostředků (Nohynek a Schaefer, 2001).

Nejdůležitějším aspektem při vývoji UV filtrů je jejich bezpečnost. Soubor informací o bezpečnosti nového UV filtru musí zahrnovat následující informace o provedených zkouškách:

1. akutní toxicita
2. iritace
3. senzibilizace
4. perkutánní penetrace/absorpce
5. fototoxicita
6. fotosenzibilizace
7. subchronická a chronická toxicita
8. toxicita pro reprodukci
9. karcinogenita

Pouze ingredience s bezpečným toxikologickým profilem a vypočítanou hranicí bezpečnosti nad hodnotu 100 jsou vhodné pro použití v kosmetické praxi.

U UV filtrů jsou požadovány následující vlastnosti:

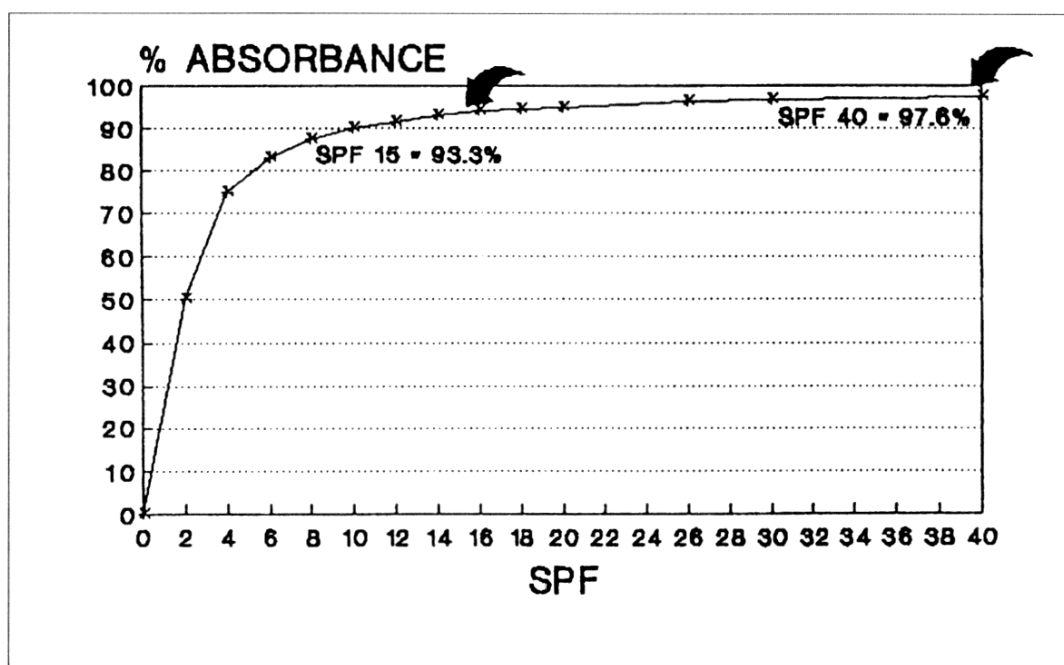
1. absorpční maxima v UVB a/nebo UVA oblasti
2. vysoká účinnost při nízké dávce

3. chemická i fyzikální stabilita včetně fotostability
4. netěkavost
5. kompatibilita s dalšími ingrediencemi ve složení
6. dostatečná rozpustnost v olejových a vodných emulzích
7. nepřítomnost dermato-toxikologických reakcí
8. minimální penetrace kůží
9. odolnost vůči potu
10. nevytváření skvrn na kůži
11. bezbarvost, bez zápachu, bez chuti,
12. kompatibilita s ekosystémem

(De Polo, 1998).

Žádný prostředek na ochranu proti UV záření nemůže odfiltrovat veškeré záření a neposkytuje tedy 100% ochranu před zdravotními riziky způsobenými UV zářením (EK, 2006).

Vztah mezi % absorbance a ochranným slunečním faktorem (SPF) je uveden v obrázku č. 9



Obrázek č. 9: Vztah mezi % absorbance a SPF (převzato z De Polo, 1998)

Ze vztahu % absorpance a výšky SPF vyplývá, že prostředky ke slunění s deklarovaným SPF = 15 absorbují 93,3% záření a výrobky s deklarovaným SPF = 40 absorbují 97,6% záření. Stanovení ochranného faktoru s vyšší hodnotou než SPF 30 je zatíženo velkou chybou a prostředky s SPF = 30 a vyšším ochranu před UV zářením významně nenavyšují a mají více méně komerční význam. Používání ochranných prostředků ke slunění s vysokých stupněm ochrany může paradoxně u uživatele navodit falešný pocit bezpečí, který jej podněcuje k delšímu pobytu na slunci a inaparetnímu příjmu vysokých dávek UV záření bez varovného zarudnutí kůže.

Filtry ultrafialového záření můžeme podle jejich účinku rozdělit do tří skupin. UV filtry účinné pro UVB oblast záření, pro UVA oblast záření a širokopásmové UV filtry, které pokrývají UVB i UVA oblast slunečního spektra. Většina UV filtrů na pozitivním seznamu vyhl. č. 448/2009 Sb., pokrývá UVB oblast záření, filtrů pro UVA oblast záření a širokopásmových filtrů je menšina.

Podle mechanismu účinku dělíme UV filtry do dvou skupin, a to na chemické a fyzikální filtry.

5.1.2. Chemické UV filtry

Obecně jsou chemické UV filtry aromatické látky, jejichž funkce je založena na schopnosti benzenového jádra transformovat vysokoenergetické UV záření na neškodné dlouhovlnné záření o vlnové délce nad 380 nm. Tato přeměna probíhá na rezonančním principu. Transformované UV záření je vyzařováno kůží ve formě tepla. (Draelos, 1995).

5.1.3. Fyzikální UV filtry

Fyzikální filtry jsou nerozpustné látky anorganické povahy. Jejich funkce je založena na rozptylu, odrazu a/nebo absorpci UV záření. Maximální účinnost mají v případě, kdy velikost částic je rovna polovině vlnové délky dopadajícího záření, t.j. velikost částic 200 - 385 nm pro viditelné světlo a 140-200 nm pro UV (De Polo, 1998).

Řada kosmetických ingrediencí, zejména pigmentů, funguje na principu fyzikálních UV filtrů. Jedná se například o oxidy železa s různým obsahem Fe_2O_3

nebo Fe_3O_4 , oxid zinečnatý, mastek nebo kaolin. Zapracováním těchto složek do receptur prostředků ke slunění lze získat nejen ochranu proti UV záření, ale i viditelnému světlu a záření infračervenému. Tyto ingredience však nelze deklarovat jako UV filtry, neboť nefigurují na seznamu povolených UV filtrů v platných právních předpisech (vyhl. č. 448/2009 Sb., Příloha VII). Nedostatkem fyzikálních UV filtrů je nežádoucí bělavý vzhled pokožky po aplikaci výrobků s obsahem anorganických filtrů. V nedávné době byly na trh uvedeny různé typy mikronizovaného oxidu titaničitého s velikostí částic blízkých se nanopartikulím, které jsou transparentní a bělavý vzhled pokožky po jejich aplikaci není patrný.

5.1.4. Značení SPF a UVA-PF u prostředků na ochranu proti slunečnímu záření

Prostředky na ochranu proti slunečnímu záření jsou kosmetické prostředky. O kosmetickém prostředku musí být uchovávány uchovávány údaje týkající se důkazu o účinku, které jsou u kosmetického prostředku deklarovány a musí být snadno dostupné příslušnému orgánu dozoru ve členském státě, kde jsou uváděny na trh (vyhl. č. 448/2009 Sb.).

Prostředky na ochranu proti slunečnímu záření by měly poskytovat ochranu nejen proti UVB složce záření, která navozuje akutní solární zánět ve formě tzv. "spálení kůže", ale i proti UVA radiaci. Při expozici UVA složce záření obdobný varovný signál v podobě zánětu (zarudnutí) kůže chybí. Tato skutečnost vyvolává někdy diskuse, že aplikace ochranných prostředků s převažujícím obsahem UVB filtrů, ale nedostatečným obsahem UVA filtrů může k rakovině kůže spíše přispívat, než před rakovinou chránit (Haywood et al., 2003).

Prostředky na ochranu proti slunečnímu záření by měly poskytovat ochranu proti UVB radiaci minimálně s ochranným slunečním faktorem (SPF) 6. Zároveň by měly poskytovat ochranu proti UVA složce záření s ochranným faktorem proti UVA (UVA-PF) rovnající se 1/3 ochranného slunečního faktoru - SPF.

Používání různých číselných údajů uváděných na etiketách k označování ochranných slunečních faktorů by mělo být zamezeno, aby se výrobky snadněji srovnávaly. Pro jednotlivé kategorie a jejich příslušné označení se doporučují následující ochranné sluneční faktory (tab.č.1). Stanovení SPF a UVA-PF by mělo být provedeno mezinárodně uznávanou metodou pro SPF a UVA-PF in vivo,

případně metodami in vitro, které poskytují rovnocenné výsledky s metodami in vivo (EK, 2006).

Kategorie uvedená na výrobku	Ochranný sluneční faktor uvedený na výrobku	Naměřený ochranný sluneční faktor	Doporučený minimální ochranný faktor proti UVA	Doporučená minimální kritická vlnová délka
"Nízká ochrana"	"6"	6 - 9,9	1/3 ochranného slunečního faktoru uvedeného na výrobku	370 nm
	"10"	10 - 14,9		
"Střední ochrana"	"15"	15 - 19,9		
	"20"	20 - 24,9		
	"25"	25 - 29,9		
"Vysoká ochrana"	"30"	30 - 49,9		
	"50"	50 - 59,9		
"Velmi vysoká ochrana"	"51 +"	$60 \leq$		

Tabulka č.1: Kategorie prostředků na ochranu proti slunečnímu záření včetně ochranných slunečních faktorů (převzato z EK, 2006)

5.1.5. Stanovení SPF in vivo a UVA-PF in vivo a in vitro

Pro stanovení SPF a UVA-PF u prostředků ke slunění je v zemích Evropského společenství prováděno podle oborových norem, které byly vydány sdružením COLIPA (COLIPA, 2006; COLIPA, 2007).

Evropská komise ve snaze sjednotit metodiku a ustanovit evropský standard pro testování výšky ochranného faktoru u prostředků ke slunění pověřila organizaci CEN přípravou příslušných ISO norem. Jedním z podkladů pro připravované normy ISO jsou postupy stanovení SPF in vivo a UVA-PF in vivo a in vitro vycházející ze současných pokynů Colipy (COLIPA, 2006; COLIPA, 2007). V zájmu ochrany probandů jsou vyvíjeny i metody stanovení SPF a UVA-PF in vitro využívající

spektrofotometrické měření (Diffey a Robson, 1989; Pissavini et al., 2003; Heinrich et al., 2004; Bendová et al., 2006; Akrmann et al., 2008).

Norma pro stanovení SPF ve skupině dobrovolníků ISO/DIS 24444: Cosmetics - Sun protection test methods - in vivo determination of SPF (Sun Protection Factor) prošla všemi procesy validace a je v tisku.

Metoda pro stanovení UVA-PF in vitro ISO/CD 24443: Deretmination of sunscreen UVA photoprotection in vitro prochází mezinárodními laboratorními kruhovými testy, je připomínkována a její vydání se očekává v blízké době.

Stanovení SPF in vivo

Účinnost ochrany před UV zářením se vyjadřuje pomocí tzv. SPF, ochranného slunečního faktoru (Sun Protection Factor). SPF je definován podílem tzv. minimální erytémové dávky (MED) pro kůži chráněnou fotoprotektivním prostředkem a MED pro kůži neošetřenou. Minimální erytémová dávka (MED) je definována jako nejnižší dávka UV záření, která způsobuje zřetelný, viditelný erytém v místě expozice 16 - 24 hodin po ozáření. Zjednodušeně to znamená, že u přípravku s ochranným faktorem 6 může exponovaná osoba prodloužit čas slunění do vzniku erytému šestkrát. V případě, že MED je u dané osoby navozen při expozici UV záření v délce 30 minut, neměl by pobyt na slunci po ošetření kůže ochranným prostředkem s SPF = 6 překročit dobu 180 minut (COLIPA, 2006).

Stanovení UVA-PF in vivo

Účinnost ochrany před UVA složkou záření se vyjadřuje pomocí tzv. UVA-PF ochranného faktoru proti UVA složce záření. UVA ochranný faktor (UVA-PF) je definován jako poměr minimální dávky způsobující pigmentaci kůže ošetřené ochranným prostředkem (MPD) a minimální dávky způsobující pigmentaci neošetřené kůže. Minimální dávka způsobující pigmentaci (MPD) je definována jako nejnižší dávka UVA záření, která způsobuje mírné ztmavnutí kůže v místě expozice 2 - 4 hodiny po ozáření (COLIPA, 2006).

Stanovení UVA-PF in vitro

Měření se provádí na standardním substrátu - polymethylmetakrylátových destičkách o ploše 16 cm², které jsou zdrsňené na standardní hrubost 2 µm. Destičky jsou transparentní pro UV, materiál nesmí být fluorescenční, musí být fotostabilní a inertní k testovanému vzorku. Testovaný výrobek je nanesen na

destičku v množství 0,75 mg/cm², dobře rozetřen a 15 minut ponechán ve tmě za pokojové teploty. Spektrofotometrické měření stanoví % propustnosti zkoušeného vzorku pro UV záření. Destička se vzorkem je následně ozářena UVA radiací a je opětovně provedeno spektrofotometrické měření. Výsledkem je hodnota pro UVA ochranu před ozářením UVA radiací a hodnota pro UVA ochranu po UVA radiaci, což dokladuje nejen hodnotu ochrany proti UVA složce slunečního záření, ale i fotostabilitu výrobku (COLIPA, 2007).

K dosažení hodnoty SPF 20 a vyšší se obvykle používá kombinace chemických a fyzikálních UV filtrů. Směsi UV filtrů mají často synergický efekt, to znamená, že směs poskytuje větší hodnotu SPF než je součet příspěvků samotných složek směsi.

Používání širokopásmových, fotostabilních filtrů zapracovaných do receptur voděodolných prostředků ke slunění, vede ke snížení expozice osob chemickým látkám. Dobře stanovená výše ochrany prostředků ke slunění chrání spotřebitele před nežádoucími účinky slunečního záření.

5.2. Rostlinné ingredience

Přírodní látky jsou používány po staletí pro péči o kůži a ošetřování různých kožních onemocnění (Aburjai et al., 2003). Bylo prokázáno, že rostlinné extrakty podporují fyziologické funkce kůže a mohou poskytovat řadu zdravích prospěšných účinků jako je zvlhčení kůže, vychytávání volných radikálů a zlepšení kožní elasticity. Dále mají zklidňující a protizánětlivé účinky, působí proti stárnutí kůže, napomáhají hojení podrážděné kůže navozené slunečním zářením nebo chemickými látkami. Tyto účinky jsou přisuzovány aktivním složkám, které dodávají energii a výživu organismu jak při perorálním podání, tak při aplikaci na kůži (Leung a Foster, 2003). Aktivní složky rostlinného původu se stávají nedílnou součástí kosmetických prostředků, zvláště v recepturách výrobků určených pro osoby s citlivou nebo suchou kůží, za účelem zlepšení stavu a vzhledu kůže a minimalizace nežádoucích účinků, zejména dráždění kůže (Weltriend et al., 2004).

5.2.1. Aloe vera - Aloe barbadensis

Jednou z nejpůvodnějších rostlin, jejichž extrakty jsou používány v recepturách kosmetických prostředků, je aloe vera (obr. č.10). Jde o sukulentní keř 50 - 80 cm vysoký se silně dužnatými listy z rodu Aloe, původem pravděpodobně ze severní Afriky nebo Kanárských ostrovů či Kapverd. Sukulenty jsou rostliny, které ve svém stonku nebo listech shromažďují vodu, a ta jim umožňuje přežití i za velmi dlouhých období sucha v pouštních a polopouštních podmínkách.

Listy aloe vera obsahují více než 75 živin a 200 aktivních látek včetně 20 minerálů (např. hořčík, zinek, vápník, chrom, měď, draslík, sodík, selen), 18 aminokyselin a 12 vitaminů (např. A, C, některé vitaminy skupiny B a kyselinu listovou).



Obrázek č.10: Aloe vera



Obrázek č.11: Průřez listem aloe vera

Listy aloe vera jsou složeny ze silné epidermis s kutikulou obklopující asimilační pletivo mesofyl, které je diferencováno na buňky chlorenchymu a tenkostěnné parenchymové buňky. Parenchymové buňky obsahují transparentní slizovitý rosol, který je nazýván jako Aloe vera gel (obr.č.11).

Zpracování aloe vera zahrnuje drcení, rozměňování a lisování. Těmito postupy se získává aloe vera juice, který je následně zpracován různými postupy. Je filtrován, sušen a podobně. Tyto postupy mohou způsobovat ireverzibilní modifikace polysacharidů a tím měnit jejich fyziologické a farmaceutické vlastnosti. Aloe vera gel na vzduchu velmi rychle oxiduje, rozkládá se a začíná ztrácet svoji biologickou aktivitu již po 6 hodinách od sklizně. Je tedy nezbytné věnovat velkou pozornost

způsobu zpracování aloe vera a je vhodné zpracovat listy aloe vera bezprostředně po sklizni (Ramachandra et al., 2008).

Z listů aloe vera jsou získávány dva hlavní produkty, a to žlutý hořký juice ze specializovaných buněk pod epidermis a slizovitý rosol (gel) z buněk parenchymu. Aloe vera obsahuje anthraglykosidy, ve většině případů C-glukosidy, zejména barbaloin, kterého může být až 30%, dále aleosin a aloeson, antrachinony (např. aloe-emodin) a resin. Složení aloe vera gelu není ještě detailně popsáno. Podle některých studií se gel skládá z více než jednoho typu polysacharidu, různé studie specifikují nejméně čtyři různé částečně acetylované lineární glukomannany s 1 - 4 glykosidovými vazbami. V dalších studiích je uváděna přítomnost galactanu, mannanu, glukomannanu, arabinanu a/nebo glucogalactomannanu (Leung a Foster, 2003).

Gel má především lokální efekt na kůži a sliznice při přímém kontaktu, protože vytváří bariéru, která chrání proti mechanické a chemické iritaci. Tato vlastnost je velmi využívaná při ošetřování špatně se hojících poranění, případně spálení. Aplikace gelu na popáleniny tiší bolest, redukuje závažnost spálení, podporuje hojení a omezuje vznik jizev. Je dokumentováno, že čerstvý juice / gel z čerstvě sklizených listů vykazuje lokální protizánětlivý a hojící účinek na kůži poškozenou sluneční expozicí. Přítomnost barbaloinu má antiseptický účinek, který snižuje riziko infekce (Juneby, 2009).

5.2.2. Zelený čaj (Green Tea) - *Camellia sinensis*

Čajovník je stále zelený keř (obr.č. 12) původem z jihovýchodní Asie pěstovaný v subtropických a tropických oblastech v různých nadmořských výškách (až nad 2000 m.n.m.). Tuhé, kožovité, kopinaté, v mládí na rubu světlé listy (obr.č.13) jsou přibližně 5 - 10 cm dlouhé a 2 - 4 cm široké. Čajové listy se sklízí většinou ručně vždy spolu s přilehlými dvěma až pěti lístky až čtyřikrát ročně.

Čaje dělíme do dvou základních skupin, a to na černý a zelený čaj. Hlavní rozdíl mezi zeleným a černým čajem spočívá ve způsobu zpracování. Při výrobě černého čaje se čajové lístky nechávají zavadnout, poté probíhá fermentace, aby došlo k narušení buněčné stěny a uvolnění obsahu buněk, tzv. "čajové vody".

Fermentace je proces, při němž enzymy (polyfenoloxidáza, peptidáza, alkoholdehydrogenáza a další) mění některé látky přítomné v čajové vodě (proteiny, aminokyseliny, polyfenoly, atd.) na sloučeniny, které jsou odpovědné za charakteristické aroma a chuť černého čaje. Při výrobě zeleného čaje k fermentačnímu procesu nedochází, oxidační proces je zastaven suchým zahřátím (čínský postup) nebo spařením (japonský postup), čímž dochází k deaktivaci enzymů (Leung a Foster, 2003).



Obrázek č. 12: Green Tea - keř



Obrázek č. 13: Green Tea - listy

Chemické složení čajů je velmi komplikované. V čaji jsou obsaženy různé látky s biologickými a farmakologickými vlastnostmi, které jsou prokázány v různých studiích in vivo i in vitro. Udává se, že tyto látky mají antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, antimutagenní a protirakovinné účinky, které jsou připisovány zejména katechinům. Oba druhy čaje, černý i zelený, obsahují kafein, teobromin a teofylin, ale v různých množstvích. Dále obsahují aromatické oleje, vitaminy, minerály. Z aktivních látek jsou v čajích zastoupeny polyfenoly, zejména katechiny, kyselina gallová a flavonoidy. Zelený čaj obsahuje rovněž velké množství fluoridů (Ferrara et al., 2001; Katiyar et al., 2007).

Největší benefit čajů je přisuzován přítomnosti antioxidantů. Použití rostlin působících jako přírodní antioxidanty a poskytujících ochranu kůži proti poškození

UV zářením je přijímáno se zvyšující se pozorností. Expozice UVB složce záření způsobuje vytváření volných radikálů, které přispívají ke karcinogenezi přímým poškozením buněčných makromolekul včetně DNA. Green tea obsahuje vysoké množství polyfenolů, což jsou přírodní antioxidanty. Polyfenol (-)epigallocatechin-3-gallate vykazuje několikrát větší antioxidační aktivitu než vitamin C nebo α -tokoferol (Katiyar et.al., 2001).

Mezi důležité aromatické složky zeleného čaje patří dimethyl sulfid spolu s benzaldehydem, benzylalkoholem, linalolem, hexenyl hexanoátem a fenylethanolem (Leung a Foster, 2003).

5.2.3. Ječmen a výtažky z ječmenného sladu - *Hordeum vulgare*

Ječmen patří k hospodářsky nejvyužívanějším rostlinám. Je popsáno 25 druhů planého ječmene a jen jeden druh kulturní, a to ječmen setý (obr. č. 14, 15). Plané druhy mohou být víceleté, kulturní druh ječmene je pouze jednoletý. K výrobě sladu slouží ječmen jarní, který představuje nejkvalitnější část produkce.



Obrázek č. 14: Ječmen setý



Obrázek č. 15: Ječmen setý - zrna

Ječmen je široce používán díky svým pozitivním vlivům na organismus. V mladém ječmeni je obsažen chlorofyl, který výrazně ovlivňuje imunitu lidského organismu. Dále se zde nachází vitaminy skupiny B, vitamin C, minerály a další látky. Mladý ječmen obsahuje 18 aminokyselin, včetně 8 esenciálních. Slad je tvořen

zejména celulosou, hemicelulosou, dextriny, škroby a sacharidy. Hemicelulosa je složka buněčné stěny endospermu - vnitřního pletiva zrn, která obsahuje zejména β -glukan.

Z ječmene s vyrábí slad a proces výroby je rozdělen do tří částí. První část procesu je máčení. Cílem je zvýšit obsah vody v zrně a nastartovat enzymatické reakce. Druhá část se nazývá klíčení a spočívá v aktivaci a syntéze enzymů (např. amylázy, glukanázy, proteázy a fosfatázy), které rozštěpí vysokomolekulární látky v zrně na látky nízkomolekulární. Dochází k rozrušení buněčných stěn tvořených hemicelulózou a bílkovinami, následně k rozštěpení škrobových zrn a bílkovinných řetězců. Závěrečnou částí výroby sladu je hvozďení. Cílem hvozďení je zastavit enzymatickou aktivitu a převést zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního stavu (Prokeš, 2006).

V ječmeni a sladu jsou obsaženy polyfenoly ve volné i vázané formě. Fenoly vykazují silnou antioxidační aktivitu způsobenou jejich schopností vychytávat volné radikály (Bonoli et al., 2004). Jsou zde přítomny zejména flavan-3-oly, flavonoly, fenolické kyseliny a nepolární estery. Flavan-3-oly jsou přítomny jako monomery, a to (+)-katechin a (-)-epikatechin, a jako polymery složené zejména z (+)-katechinu, (+)-gallokatechinu. Další antioxidanty přítomné v ječmeni i sladu jsou karotenoidy (lutein, zexanthin) a α -tokoferol, β -tokoferol a γ -tokoferol (Goupy et al., 1999). Dále jsou zde zastoupeny prokyanidiny B3 a C2, kyselina p-kumarová, kyselina ferulová a kyselina vanilinová. Je prokázáno, že antioxidační aktivita sladu je větší než vlastního ječmene. Obsah fenolických sloučenin je ve sladu vyšší než v ječmeni, přičemž poměr jednotlivých látek je téměř identický. Tyto výsledky podporují hypotézu, že lepší extrakce flavonoidů a fenolických kyselin je dosaženo po procesu hvozďení (Maillard et al. 1996).

5.2.4. Pšenice obecná - *Triticum vulgare*

Pšenice - čeleď lipnicovité - (obr. 16, 17) pochází z jihozápadní Asie, kam patří přibližně 20 druhů, a to jak šlechtěných, tak planě rostoucích. Pšenice je jedna z nejpoužívanějších plodin, která je zpracovávána téměř celá. Zrna pšenice se

používají jako potraviny, krmivo a rovněž jako surovina zejména pro výrobu škrobu a lihu, dále jsou rovněž využívána stébla (sláma) a otruby (semenné slupky).

Zrna pšenice obsahují významné množství přírodních antioxidantů. Antioxidanty obsažené v zrnech pšenice jsou ze skupiny nízkomolekulárních látek a zahrnují karotenoidy, tokoferoly, lignany a fenolické kyseliny.



Obrázek č. 16: Pšenice obecná



Obrázek č. 17: Pšenice obecná - zrno

Tyto látky mohou chránit životně důležité molekuly jako DNA a enzymy od oxidativního poškození způsobeného různými mechanismy. Antioxidanty pšenice mohou například reagovat přímo s reaktivními formami kyslíku (ROS) jako jsou hydroxylové radikály nebo singletové molekuly kyslíku a ukončit tak jejich působení na biologické molekuly. Mohou rovněž tvořit chelatační komplexy s kovy a redukovat tak jejich schopnost působit jako katalyzátor tvorby volných radikálů.

Antioxidanty přítomné v pšeničných zrnech jsou látky velmi různorodé jak z hlediska jejich molekulové hmotnosti, tak z hlediska jejich struktury. V pšeničných zrnech a otrubách jsou přítomny další bioaktivní látky označované obecně jako fytochemikálie. Mezi ně patří například fytoosteroly a fytostanoly, fenolické kyseliny, flavonoidy, karotenoidy a tokoferoly. Tyto látky vykazují silnou antioxidantní aktivitu (Liangli, 2008).

Kromě extraktů z pšeničných zrn jsou používány i extrakty z klíčků. Ty obsahují rovněž řadu látek příznivých pro organismus. Hlavní látkou obsaženou

v tomto extraktu je oktakosanol, vitamin E (známý antioxidant) a dále kyselina linoleová (omega-6), palmitová, oleová a linolenová (omega-3). Ve výtažcích z klíčků jsou jako hlavní složky přítomné steroly, a to 4-methyl steroly, β -sitosterol a kampesterol. Také je prokázána přítomnost flavonoidů xantofylu a esterů xantofylu (Barnes, 2006).

5.2.5. Bazalka posvátná - *Ocimum sanctum*

Bazalka (obr č. 18, 19) je rod rostlin zahrnující téměř 60 druhů, ale hojně jich je využíváno pouze 7. Většina druhů je rozšířena v Africe a Jižní Americe, několik jich je pěstováno po celém světě. Bazalka je jednoletá bylina, průměrně 30 cm vysoká, kvetoucí v červnu až září. Nať se používá hojně v lidovém léčitelství a listy v sušeném, případně čerstvém stavu jako koření.



Obrázek č. 18: Bazalka pravá



Obrázek č. 19: Bazalka posvátná

Různé druhy bazalky se liší ve složení a uplatňuje se vliv přírodních faktorů jako je teplota, geografická poloha, složení půdy a množství srážek.

Esenciální olej z bazalky je získáván parní destilací. Běžně komerčně dostupné jsou dva typy esenciálních olejů, a to tzv. "sweet", který je vyráběn v Evropě a USA a "exotic" připravovaný na Komorských ostrovech, Seychelách a Madagaskaru. Oleje získávané různými způsoby destilace se liší v obsahu *d*-kafru, linalolu a estragolu. Pro esenciální olej "sweet" je charakteristická vysoká koncentrace linaloolu a methyl chavikolu v poměru 2 nebo 3 : 1. Esenciální olej "exotic" obsahuje methyl chavikol s kafrem a jen málo nebo žádný linalool, α -pinen, eugenol nebo 1,8-cineol (Leung a Foster, 2003; Simon, 1998).

Esenciální oleje z bazalky jako hlavní složku obsahují fenyylpropanoidy, zejména eugenol a methyl eugenol. V esenciálním oleji z bazalky jsou obsaženy monoterpeny (například kamfen, sabinen, limonen), oxidované monoterpeny (linalool a borneol) a sesquiterpeny (například selinen, murolen). Dále jsou zde *d*-linalool a estragol, methyl cinamát, eugenol, borneol, geraniol, β -karyofylen, α -terpineol, kafr, limonen, ocimen, methyleugenol, safrol a další látky (Suanarunsawat et al., 2009).

Bazalce jsou připisovány různé léčivé vlastnosti. Pro jednotlivé části bazalky (listy, stonek, květy, semena, atd.) se udávají terapeutické vlastnosti a jsou používány v tradičním lidovém léčitelství pro zlepšení vykašlávání, jako analgetikum, antihistaminikum, antiemetikum a další. U esenciálního oleje z listů je metodami *in vitro* prokázána antibakteriální a antivirová aktivita a eugenol obsažený v esenciálních olejích vykazuje protizánětlivé účinky (Prakash et al., 2005).

5.2.6. Ostropestřec mariánský - *Silybum marianum*

Ostropestřec (obr. č. 20, 21) je jednoletá až dvouletá bylina původem ze Středozeří, severozápadní Afriky a Malé Asie. Dorůstá výšky 30 - 200 cm v závislosti na půdních a klimatických podmínkách. Používá se v lidovém léčitelství více jak 2000 let, sbírají se hlavně plody, někdy i list a kořen. Používá se zejména pro své hepatoprotektivní a antioxidantní účinky (Leung a Foster, 2003).

Aktivní složkou v ostropestřci je silymarin. Standardizovaný extrakt získaný ze semen ostropeřce obsahuje přibližně 70 - 80% flavonolignanů a přibližně 20 - 30% chemicky nedefinovaných frakcí zahrnujících polyfenoly. Hlavní složkou

silymarinového komplexu je silybin a dalšími složkami jsou zejména isosilybin, dehydrosilybin, silychristin, silydianin, taxifolin a quercetin.

Fotoprotektivní kožní mechanismy spuštěné silymarinem a silybinem dokumentují jejich schopnost redukovat škodlivé účinky UV záření jako je oxidativní stres, zánět, imunitní odpověď a poškození DNA stejně jako rozvoj apoptózy. Účinek silybinu na apoptózu vyvolanou UVB radiací byl zaznamenán v řadě studií in vitro (Křen et al., 2005). Bylo prokázáno, že aplikace silybinu před zářením způsobuje nárůst apoptózy, zatímco aplikace silybinu po ozáření před apoptózou chrání.



Obrázek č. 20: Ostropestřec mariánský Obrázek č. 21: Ostropestřec - květ

Obsah silymarinu v rostlině závisí na druhu ostropeřce, na geografických a klimatických podmínkách.

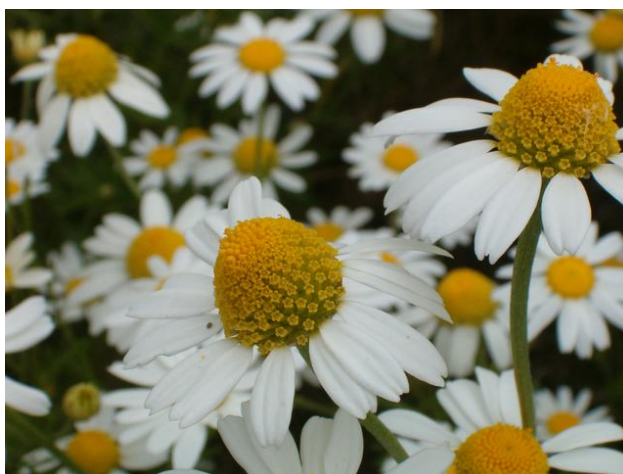
5.2.7. Heřmánek pravý - *Matricaria recutita*

Heřmánek pravý (obr.č. 22) je jednoletá bylina okolo 50 cm vysoká, původem z Evropy, severní a západní Asie, intenzivně pěstovaná v zemích střední Evropy, Egyptě a Argentině. Kvete od června do srpna a duté květní lůžko je poznávací znak, kterým ho lze odlišit od heřmánkovce nevonného, se kterým je často zaměňován.

Z heřmánku je pro další zpracování používán květ, ze kterého je esenciální olej získáván parní destilací. Čerstvý olej má modrou barvu díky obsahu azulenu.

Heřmánek pravý je známý také pod názvem heřmánek německý. Druhým typem heřmánku, který je často používán, je silně aromatický heřmánek římský (rmen sličný).

Heřmánek pravý obsahuje různé množství těkavého oleje (0,24 - 1,9%) modré barvy - azulen. Mezi flavonoidy, v něm obsažené, patří apigenin, apigetrin, apiin, rutin, luteolin a quercimetritin. Dále jsou zde přítomny kumariny, a to umbelliferon a jeho methyl éter herniarin. Z dalších látek jsou zde přítomny proazuleny, polysacharidy, aminokyseliny, cholin a další. Těkavé oleje obsahují chamazulen, farnesen, α -bisabolol. Jako dvě hlavní složky jsou označován α -bisabolol a chamazulen, jichž je v oleji mezi 50 - 65%.



Obrázek č. 22: Heřmánek pravý

Heřmánek pravý má řadu farmakologických vlastností. U esenciálního oleje jsou prokázány antibakteriální a fungicidní účinky. Zejména je účinný proti gram-pozitivním bakteriím (např. *Staphylococcus aureus*) a proti *Candida albicans*. U chamazulenu se udávají účinky proti bolesti, hojící, protizánětlivé a antimikrobiální vlastnosti. U α -bisabololu se udávají účinky protizánětlivé a antimikrobiální. Oba druhy heřmánku, pravý i římský, mohou způsobovat kontaktní dermatitidu u lidí. Oleje z obou druhů heřmánku jsou obecně považovány za netoxické při externí aplikaci (Leung a Foster, 2003; Presibella et al., 2006).

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Všechny studie provedené ve skupině dobrovolníků v rámci této práce byly schváleny Etickou komisí Státního zdravotního ústavu Praha. Výběr dobrovolníků a metody testování byly provedeny v souladu s etickými principy testování zakotvenými v Helsinské deklaraci a v Mezinárodních etických předpisech pro biomedicínský výzkum (CIOMS, 2002). Předpokladem pro zařazení probandů do studií bylo vyplnění dotazníku o zdravotním stavu, splnění zdravotních kritérií pro účast ve studii a podpis individuálního informovaného souhlasu. V průběhu testů byla zajištěna péče dermatologa.

6.1. Cíle práce

6.1.1. Penetrace / absorpce a účinnost Cosolu E

Cílem této části práce bylo stanovení penetrace/absorpce nově vyvinutého UV filtru pro doplnění jeho toxikologického profilu. Penetrace byla provedena pro 33%ní vodnou disperzi s průměrnou velikostí částic 80 nm, pro 33%ní vodnou disperzi s průměrnou velikostí částic 200 nm a pro fotoprotektivní emulzi, ve které byla zpracována disperze s průměrnou velikostí částic 200 nm.

Po vyhodnocení všech provedených toxikologických zkoušek bylo provedeno stanovení výšky ochranného faktoru ve skupině dobrovolníků pro čtyři emulze s různým obsahem Cosolu E s předpokládaným SFP 10, SPF 25, SPF 30 a SPF 40.

6.1.2. Penetrace / absorpce a fototoxicita éterických olejů

Cílem této části práce bylo hodnocení potenciálu fototoxicity ve skupině dobrovolníků u komerčně dostupných éterických olejů - bergamot, Litsea cubeba, pomeranč a citron od různých dodavatelů.

Zkouška penetrace byla provedena pro bergamotový olej (Schupp, Německo) se standardním přídatkem bergaptenu a pro citral (Aroma, Česká republika).

6.1.3. Hydratační účinky aloe vera

Cílem této části práce bylo vyhodnocení účinku aktivních ingrediencí získaných z aloe vera na zvýšení hydratace kůže. První skupina výrobků obsahovala jako aktivní látku prášek - Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder

v množství 0,5% a druhá skupina obsahovala jako aktivní látku přírodní šťávu z listů - Aloe Barbadensis Leaf Juice v koncentracích 11%, 23% a 36% ve finálním výrobku. Hydratační účinky přípravků se zapracovanými aktivními ingrediencemi byly porovnány oproti přípravkům bez přítomnosti aktivní látky, a to jako po jednorázové, tak po opakované aplikaci.

6.1.4. Ochranné účinky rostlinných ingrediencí

Cílem této části práce bylo vyhodnocení významu začlenění vybraných rostlinných ingrediencí používaných v kosmetických prostředcích do formulací čisticích kosmetických prostředků za účelem minimalizovat možné nežádoucí účinky tenzidů, např. laurylsíranu sodného (SLS). Protektivní účinek proti SLS pro ingredience Green Tea, Aloe Vera, Pronalen Sunlife, Pronalen Cereal, Pronalen Sensitive Skin a Chamomile byl testován metodami in vitro v buněčné kultuře 3T3 fibroblastů a na rekonstruovaném modelu lidské kůže (EpiDerm™). Výsledky byly ověřeny in vivo kožním testem ve skupině dobrovolníků.

6.2. Materiál a metodika

6.2.1. Penetrace / absorpce

Éterické oleje

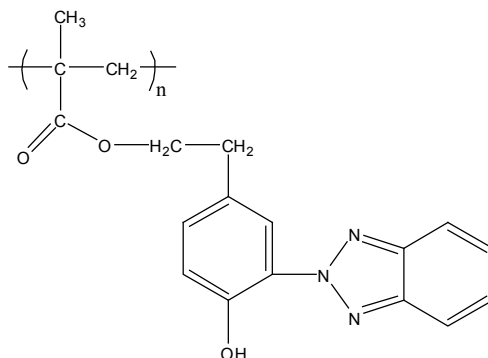
Zkouška penetrace byla provedena pro bergamotový olej Schupp se standardním přídatkem bergaptenu (5-methoxypsoralen, CAS 484-20-8, Sigma-Aldrich Chemie, Německo) a pro citral (CAS 5392-40-5, Aroma, Česká republika).

Filtry ultrafialového záření

Zkouška penetrace byla provedena pro UV filtr Cosol E (obr.č.23) o velikosti částic přibližně 200 nm (3% vodná disperze), pro UV filtr Cosol E o velikosti částic přibližně 80 nm (33% vodná disperze) a pro fotoprotektivní emulzi s obsahem Cosolu E 9% s velikostí částic 200 nm.

Složení fotoprotektivní emulze (INCI): Aqua, Cosol E (částice 200 nm), Paraffinum liquidum, Caprylic/Capric Triglyceride, Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate, Glycerin, C12-15 Alkyl Benzoate, Cera Alba, Dimethicone, Tocopheryl Acetate,

Polyacrylamide, C13-14 Isoparaffin, Laureth-7, 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol, Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone, Parfum.



Obrázek č. 23: Struktura Cosolu E

6.2.1.1. Penetrace / absorpce kůží - metodika

Zkouška byla provedena dle nařízení Komise (ES) č.440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Metoda B.45. Absorpce kůží: metoda *in vitro*). a podle metodiky OECD (OECD, 2004b).

Příprava kůže

Pro zkoušky penetrace byla použita prasečí kůže ze samice, stáří 100 - 150 dní, bez spaření. Z hřbetní části kůže byly odděleny 2 pásy kůže o velikosti 20 x 70 cm cca 10 cm nalevo i napravo od páteře. Kůže byla zbavena podkožního tuku, štětín a byly z ní vyseknuty terčíky o průměru 5 cm (obr.č.24). Po zpracování byly terčíky kůže zmrazeny na -18°C . Před vlastním pokusem byly rozmrazeny na vzduchu při pokojové teplotě (2-3 hodiny).

Penetrace postup

Na magnetické míchačce nastavené na 310 otáček/min. (Variomag Poly, Labortechnik AG, Německo) byla sestavena aparatura z Franzových difúzních komůrek, vzájemně propojených silikonovými hadičkami (obr.č.25). Celý systém byl

napojen na lázeň s termostatem a pumpou (Julabo MB, Labortechnik GmbH, Německo), vodní lázeň byla nastavena na 34°C.

Do vnitřní části Franzovy komůrky bylo vloženo míchadlo a spodní část komůrky byla naplněna recepční tekutinou (0,9% chlorid sodný MERCK, 1% bovinní albumin Sigma A9647-50G, 0,05% gentamycin Fluka 48760).

Vzorky byly aplikovány v množství 20 µl doprostřed terčíku kůže, který byl překrytý skleněnou čepičkou. V případě penetrace těkavých látek (éterické oleje) byl vršek čepičky uzavřen parafilmem. Doba expozice byla pro éterické oleje 1 a 24 hodin, pro UV filtry a fotoprotektivní emulzi 24 hodin.

Po ukončení expozice bylo provedeno stripování svrchních vrstev epidermis (stratum corneum) isolepou Tesa, šíře 2,5 cm. Při každém stripu byla kůže pootočena, páska byla na kůži přitlačena příčným pohybem nůžek a následně byla z kůže odtržena (obr.č.26, 27).

Pro konečné oddělení oddělení epidermis od dermis byla kůže stranou epidermis přitlačena na horkou plotnu (cca 80°C) na 15 - 20 vteřin a kulatou špachtlí byla oddělena epidermis od dermis (obr.č.28). Zbývá dermis byla rozstříhána na kousky (obr.č.29).



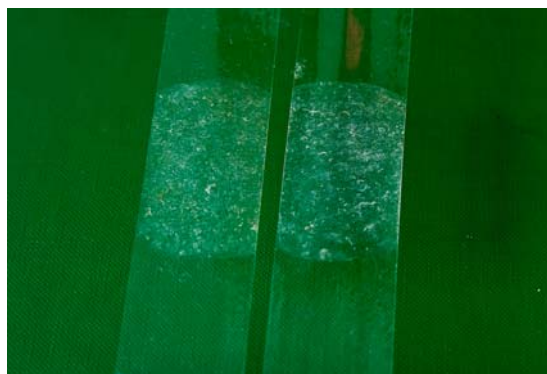
Obrázek č. 24: Terčíky prasečí kůže



Obrázek 25: Franzovy komůrky



Obrázek č. 26: stripování kůže



Obrázek č. 27: Stripy stratum corneum na Tesa pásce



Obrázek č.28: Oddělení epidermis od dermis



Obrázek č.29: Rozstříhaná epidermis

6.2.1.2. Způsob aplikace a analýza éterických olejů

Bergamotový olej Schupp byl obohacený bergaptenem na koncentraci 6,76 mg bergaptenu / 1 g bergamotového oleje. Citral byl aplikován bez úpravy. Éterické oleje byly aplikovány v každém testu na dva terčíky kůže, pro každou látku byla zkouška opakována ve dvou nezávislých pokusech. Stripy ze stratum corneum byly umístěny do plastových nádobek vždy v párech. Uspořádání frakcí je uvedeno v tabulce č. 2.

č.frakce	popis	č.frakce	popis
1	oplach čepičky	8	strip 11-12
2	látka setřená z povrchu kůže	9	strip 13-14
3	strip 1-2	10	strip 15-16
4	strip 3-4	11	epidermis
5	strip 5-6	12	dermis
6	strip 7-8	13	receptor fluid - recepční tekutina
7	strip 9-10		

Tabulka č.2: Uspořádání frakcí při testování éterických olejů

K jednotlivým frakcím bylo přidáno extrakční činidlo isopropanol (CAS 67-63-0, Merck Německo) / voda, v poměru 50 : 50. Frakce byly extrahovány po dobu 24 hodin, následně byly přefiltrovány přes mikrofiltry (Spartan 30/0,2RC , Schleicher & Schuell, Německo) a analyzovány.

Analýza jednotlivých frakcí byla provedena pomocí tandemu plynového chromatografu Agilent 7890A a hmotnostního detektoru Agilent 5975C (GC/MS). Detaily chromatografické analýzy jsou uvedeny v metodice fototoxicita. Kvantifikace byla provedena metodou standardního přídatku.

6.2.1.3. Způsob aplikace a analýza Cosolu E

a) Aplikace na 3 paralelní terčičky kůže

Filtr ultrafialového záření Cosol E ve formě vodné disperze o velikosti částic 80 nm (33%ní), ve formě vodné disperze o velikosti částic 200 nm (33%ní) a fotoprotektivní emulze se zapracovaným Cosolem E o velikosti částic 200 nm byly aplikovány v každém testu na 3 terčičky kůže. V případě Cosolu E byl test opakován ve dvou nezávislých pokusech a v případě fotoprotektivní emulze byla zkouška opakována ve třech nezávislých pokusech. Vzhledem k nízkému obsahu analyzované látky byly jednotlivé frakce poolovány vždy ze tří terčičků kůže. Uspořádání frakcí je uvedeno v tabulce č. 3.

č.frakce	popis	č.frakce	popis
1	oplach čepiček z kůží 1-3	12	strip 9 z kůží 1-3
2	látka setřená z povrchu kůží 1-3	13	strip 10 z kůží 1-3
3	strip 1 z kůží 1-3	14	strip 11 z kůží 1-3
4	receptor fluid-recepční tekutina	15	strip 12 z kůží 1-3
5	strip 2 z kůží 1-3	16	strip 13 z kůží 1-3
6	strip 3 z kůží 1-3	17	strip 14 z kůží 1-3
7	strip 4 z kůží 1-3	18	strip 15 z kůží 1-3
8	strip 5 z kůží 1-3	19	strip 16 z kůží 1-3
9	strip 6 z kůží 1-3	20	epidermis
10	strip 7 z kůží 1-3	21	dermis
11	strip 8 z kůží 1-3		

Tabulka č.3: Uspořádání frakcí při testování éterických olejů

b) Aplikace na 2 paralelní terčíky kůže

Filtr ultrafialového záření Cosol E ve formě vodné disperze o velikosti částic 80 nm (33%ní) a ve formě vodné disperze o velikosti částic 200 nm (33%ní) byl aplikován v každém testu na dva terčíky kůže, test byl opakován ve dvou nezávislých pokusech. Stripy ze stratum corneum byly umístěny do plastových nádobek vždy v párech. Uspořádání frakcí je uvedeno v tabulce č. 4.

č.frakce	popis	č.frakce	popis
1	oplach čepičky	8	strip 11-12
2	látka setřená z povrchu kůže	9	strip 13-14
3	strip 1-2	10	strip 15-16
4	strip 3-4	11	epidermis
5	strip 5-6	12	dermis
6	strip 7-8	13	receptor fluid-recepční tekutina
7	strip 9-10		

Tabulka č.4: Uspořádání frakcí při testování éterických olejů

K jednotlivým frakcím bylo přidáno extrakční činidlo 1,4-Dioxane (CAS 123-91-1), frakce byly extrahovány po dobu 24 hodin, následně byly přefiltrovány přes mikrofiltry (Spartan 30/0,2RC , Schleicher & Schuell, Německo) a analyzovány.

Analýza jednotlivých frakcí byla provedena spektrofotometricky (spektrofotometr Unicam, Helios Beta). Metoda je založena na stanovení molárního absorpčního koeficientu standardu Cosolu E při vlnové délce 340 nm, což odpovídá jeho absorpčnímu maximu. U jednotlivých vzorků pak byla změřena jejich absorpční spektra proti absorpčním spektrům příslušného pozadí. Pozadí bylo stanoveno ze vzorků penetrace bez přídavku Cosolu E. Po odečtení absorpce při absorpčním maximu 340 nm, byla vypočtena koncentrace přípravku v daném vzorku.

6.2.2. Fototoxicita

Éterické oleje

Ve studii fototoxicity provedené ve skupině dobrovolníků byly použity komerčně dostupné éterické oleje uvedené v tabulce č. 5.

Éterický olej	CAS číslo	Označení podle dodavatele
bergamot	8007-75-8	Aroma (Praha) Biomedica (Praha) SIGMA AG (Německo) Schupp GmbH (Freudenstadt, Německo)
Litsea cubeba	68855-99-2	Aroma (Praha) Biomedica (Praha)
pomeranč	8008-57-9	Aroma (Praha) Eoné (Krásná Lípa)
pomeranč bez terpenů		Cosmetic Karl Hadek International (Ústí nad Labem)
citron	8008-56-0-8	Aroma (Praha) Eoné (Krásná Lípa)
citron bez terpenů		Cosmetic Karl Hadek International (Ústí nad Labem)

Tabulka č. 5: Seznam a označení éterických olejů

6.2.2.1. Chromatografická analýza éterických olejů

Složení éterických olejů bylo stanoveno pomocí tandemu plynového chromatografu Agilent 7890A a hmotnostního detektoru Agilent 5975C (GC/MS). Detaily chromatografické analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Kolona	HP-5ms
Délka	30 m
Vnitřní průměr	0,25 mm
Tloušťka stacionární fáze	0,25 μ m
Teplotní režim	60 do 250°C
Nástřík	Split 20:1
Nosný plyn	Helium
Typ ionizace	elektronová 70 eV

Tabulka č.6: Parametry chromatografické analýzy

Vzorky éterických olejů byly ředěny acetonitrilem v poměru 1:10. Interpretace retenčních časů a spekter byla prováděna porovnáním naměřených výsledků s komerčně dostupnými údaji (Adams, 1995).

6.2.2.2. Test fototoxicity ve skupině dobrovolníků

Epikutánní testy fototoxicity ve skupině dobrovolníků byly provedeny dle postupu popsaného Neumannem (Neumann et al., 2000).

Postup zkoušky

Studie zahrnovala jednorázový uzavřený kožní test (patch-test v okluzi na spodní části zad) a následné ozáření solárním simulátorem UV-Sun Simulator, typ SOL-500, který byl doplněn filtrem typu H1 s účelem odfiltrout převážnou část záření UVB, od firmy Dr. Hönle. Intenzita záření byla kontrolována pomocí UVA radiometru, typ No.37 (Dr. Hönle, Planegg, Německo).

Testované vzorky byly ředěny ve vodě pro tkáňové kultury nebo v sezamovém oleji (Sesami oleum, raffinatum, Henry Lamotte GmbH, Bremen). Na spodní části zad dobrovolníků 10 cm od páteře, nalevo i napravo, byly aplikovány

v okluzi testované vzorky pomocí saturovaných terčů filtračního papíru o průměru 0,8 cm. Doba expozice byla 1 hodina. Zbytky testované látky byly odstraněny jemným setřením. Ihned po sejmutí patch testu byla levá část zad ozářena solárním simulátorem v celkové dávce UVA 5 J/cm². Intenzita záření byla 5 mW/cm², vzdálenost zářiče od ozařované plochy cca 35 cm, doba záření 15 - 20 minut. Pravá část zad bez ozáření sloužila jako kontrola. Odečet reakcí ve smyslu erytému a edému byl prováděn ihned po ozáření a v intervalech 24, 48 a 72 hodin po ozáření. Pro výpočet a vyhodnocení potenciálu fototoxicity (počet pozitivních reakcí/počet subjektů) byly použity hodnoty zaznamenané v intervalech odečtu 24, 48 a 72 hodin.

Okluzivní náplasti: Finn Chamber (Finn Chamber on Scanpor, Eptest Ltd Oy, Finsko).

6.2.3. Stanovení SPF u fofoprotektivních emulzí

Stanovení SPF ve skupině dobrovolníků bylo provedeno pro fotoprotektivní prostředky s předpokládaným SPF 10, SPF 25, SPF 30, a SPF 40. Složení jednotlivých emulzí je uvedeno v tabulce č. 7.

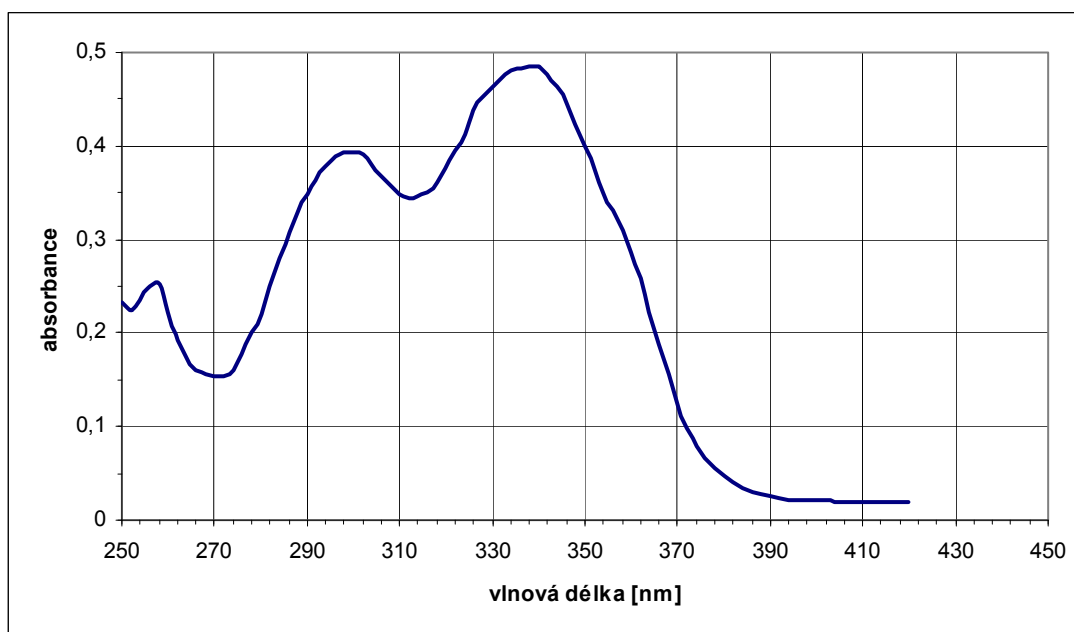
Ingredience (INCI)	Fotoprotektivní prostředky			
	SPF 10	SPF 25	SPF 30	SPF 40
Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate	3-5%	3-5%	3-5%	3-5%
Diethylhexyl Carbonate	4-6%	4-6%	4-6%	4-6%
Caprylic/Capric Triglyceride	2-4%	2-4%	2-4%	2-4%
C12-15 Alkyl Benzoate	2-3%	2-3%	2-3%	2-3%
Cetearyl Alcohol	1-2%	1-2%	1-2%	1-2%
Paraffinum Liquidum	3-10%	3-10%	3-10%	3-10%
Dimethicone	1-2%	1-2%	1-2%	1-2%
Glycerin	3-5%	3-5%	3-5%	3-5%
Polyperfluoroethoxymethoxy Difluoromethyl Distearamide	0,4 - 1%	0,4 - 1%	0,4 - 1%	0,4 - 1%
Polyacrylamide, C13-14 Isoparaffin, Laureth-7	0,5-1%	0,5-1%	0,5-1%	0,5-1%

Xanthan Gum	0,1-0,4%	0,1-0,4%	0,1-0,4%	0,1-0,4%
Cera Alba	0%	0%	1-2%	1-2%
2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol, Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone	0,15%	0,15%	0,15%	0,15%
Parfum	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
Tocopheryl Acetate	0,3-0,6%	0,3-0,6%	0,3-0,6%	0,3-0,6%
Cosol E (velikost částic 200 nm)	9%	10%	13,5%	18%
Octocrylene	0%	10%	10%	10%
Butyl Methoxydibenzoylmethane	0%	2%	2%	2%
Ethylhexyl Methoxycinnamate	1%	0%	0%	0%
Aqua	ad 100%	ad 100%	ad 100%	ad 100%

Tabulka č.7: Složení fotoprotektivních emulzí

6.2.3.1. Spektrální křivka Cosolu E

Nově vyvinutý širokospektrální UV filtr COSOL E rozpuštěný v dioxanu má dvě charakteristické absorpční vlny s maximy při 300 nm a 340 nm (graf č.1).



Graf č. 1: Spektrální křivka Coslou E v dioxanu

6.2.3.2. Stanovení SPF in vivo - metodika

Zkouška stanovení SPF in vivo byla provedena dle International Sun Protection Factor (SPF) Test Method (COLIPA - The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association; CTFA-SA - Cosmetic, Toiletry & Fragrance Association of South Africa; JCIA - Japan Cosmetic Industry Association, 2006).

Princip metody

Ochranný faktor (SPF) je definován jako poměr minimální erytémové dávky na kůži ošetřené ochranným prostředkem (MED_p) a minimální erytémové dávky na neošetřené kůži (MED_u) u jednoho subjektu.

Minimální erytémová dávka (MED) je definována jako nejnižší dávka UV záření, která způsobuje zřetelný, viditelný erytém v místě expozice 16 - 24 hodin po ozáření.

$$SPF = \frac{MED_p - \text{ošetřená kůže}}{MED_u - \text{neošetřená kůže}}$$

Ochranný faktor SPF u ochranného prostředku je aritmetickým průměrem individuálních hodnot SPF všech probandů v testu.

Zdroj záření

UV simulátor Model 601-300 (Solar Light Co., USA), kontinuální emisní spektrum 290 - 400 nm, simulující sluneční záření. Simulátor ozařuje plochu 5 x 6 cm v šesti bodech o průměru 1 cm, sérií dávek rostoucích geometrickou řadou (faktor 1,25, resp. faktor 1,12 pro výrobky s SPF vyšším než 25).

Pro měření dávky a automatické dávkování záření je používán radiometr PMA 2100-DCS (Dose Control System Solar Light, USA).

Standard

Pro test byl použit standard P2 s následujícími parametry:

Standard (dle metodiky Colipa)	Průměrná hodnota SPF	Rozsah hodnot (± 2 SD)	
		dolní limit	horní limit
P2	16,6	14,2	19,0

Dobrovolníci

Pro stanovení SPF byli vybráni dobrovolníci s fototypem kůže I - III (klasifikace podle Fitzpatricka) (Fitzpatrick, 1988). Klasifikace je uvedena v tabulce č. 8.

Kožní fototyp	Popis
fototyp I	vždy se snadno spálí, nikdy se neopálí
fototyp II	vždy se snadno spálí, opálí se minimálně
fototyp III	spálí se mírně, opálí se pozvolně
fototyp IV	spálí se minimálně, vždy se dobře opálí
fototyp V	spálí se zřídka, opálí se značně
fototyp VI	nikdy se nespálí, dokonale pigmentovaný

Tabulka č.8: Klasifikace kožních fototypů podle Fitzpatricka

Aplikace vzorku

Na horní části zad bylo vyznačeno 6 ploch o rozměrech 5 x 6 cm. První byla určena pro stanovení MED_u , druhá plocha byla určena pro kontrolní stanovení SPF u standardního vzorku P_2 , plochy třetí až šestá byly určeny pro testované vzorky. Vzorky a standard P_2 byly aplikovány v množství 2 mg/cm^2 . Navážené množství vzorku i standardu bylo nanášeno na vyznačenou plochu a rozetřeno do homogenní vrstvy vertikálními i horizontálními tahy prstem (cca 30 sekund). Aplikace proběhla 15 minut před zářením.

UV expozice

U všech probandů byla stanovena minimální erytémová dávka (MED) pro neošetřenou plochu (MED_u); plocha byla exponována základní sérií dávek (11 - 33 mJ/cm^2 pro faktor 1,25; 15 - 26 mJ/cm^2 pro faktor 1,12).

Pro standard P2 byla stanovena minimální erytémová dávka (MED_{P2}) při navýšení expozice 16 krát. Pro vzorek s SPF 10 byla stanovena minimální erytémová dávka ($MED_{SPF 10}$) při navýšení, expozice 10 krát. Pro vzorek s SPF 25 byla stanovena minimální erytémová dávka ($MED_{SPF 25}$) při navýšení expozice 25 krát. Pro vzorek s SPF 30 byla stanovena minimální erytémová dávka ($MED_{SPF 30}$); expozice byla navýšena 30 krát. Pro vzorek s SPF 40 byla stanovena minimální erytémová dávka ($MED_{SPF 40}$); expozice byla navýšena 40 krát.

Odečet reakcí

Odečet reakcí (zřetelný, viditelný erytém) probíhal v intervalu 16 - 24 hodin po skončení záření. U každého probanda byla zaznamenána minimální erytémová dávka odpovídající zřetelnému, viditelnému erytému na neošetřené kůži, na kůži ošetřené standardem a kůži ošetřené testovanými vzorky.

Kalkulace výsledků

Ochranný faktor SPF je vyjádřen jako aritmetický průměr individuálních hodnot SPF_i získaných u jednotlivých probandů.

Ze statistického hodnocení byly vyloučeny hodnoty individuálních SPF_i , pokud u probandů série dávek nevyvolala erytémovou reakci v žádném místě expozice příslušné plochy, série dávek vyvolala erytémovou reakci v náhodných místech expozice příslušné plochy nebo série dávek vyvolala erytémovou reakci ve všech místech expozice příslušné plochy.

Při výpočtu SPF z individuálních hodnot SPF_i byla stanovena směrodatná odchylka a interval spolehlivosti. Stanovená hodnota SPF platí v případě, pokud interval spolehlivosti je menší nebo roven 17%.

6.2.4. Stanovení hydratace

Hydratační studie byla provedena ve 2 skupinách výrobků s různou formou aktivní látky aloe vera.

První skupina výrobků byla připravena firmou ttz Bremerhaven (Německo) a obsahovala jako aktivní látku Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder v množství 0,5% precipitátu z Aloe Vera. Byly připraveny 2 formulace, AMAY Cream s přídavkem aktivní látky a AMAY Placebo bez přídavku aktivní látky.

Složení AMAY Cream (INCI):

Aqua, Paraffinum Liquidum, Trilaureth-4 Phosphate, Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Polymer, Propylene Glycol, Diazolidinyl Urea, Methylparaben, Propylparaben, Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder (0,5%).

Druhá skupina výrobků byla připravená firmou Gradiens (Maďarsko) a obsahovala jako aktivní látku Aloe Barbadensis Leaf Juice v koncentracích 11%, 23% a 36% ve finálním výrobku. Rovněž v této skupině výrobků byla připravena receptura bez přítomnosti aktivní látky - Aloe Vita placebo.

Složení Aloe Vita gel (INCI):

Aqua, Alcohol, Glycerin, Propylene Glycol, Polysorbate 60, Cetyl Alcohol, Carbomer, Triethanolamine, Lavandula Angustifolia Extract, Methylparaben, Aloe Barbadensis Leaf Juice v koncentracích 11%, 23% a 36%.

6.2.4.1. Stanovení hydratace - metodika

Zkouška stanovení hydratace byla provedena podle principů uvedených v postupech COLIPA (COLIPA, 2008).

Aplikace vzorků a intervaly měření - jednorázová aplikace

Testovaný vzorek AMAY Cream byl aplikován na volární předloktí pravé ruky, ve vzdálenosti 5 cm distálně od loketní jamky v množství 2 mg/cm² a vzorek AMAY Placebo byl aplikován na volární předloktí levé ruky, ve vzdálenosti 5 cm distálně od loketní jamky v množství 2 mg/cm²

Testované vzorky Aloe Vita Cream 11% aloe juice a Aloe Vita Cream 23% aloe juice byly aplikovány na volární předloktí pravé ruky, ve vzdálenosti 5 cm, respektive 10 cm distálně od loketní jamky v množství 2 mg/cm² a vzorky Aloe Vita

Cream 36% aloe juice a Aloe Vita Placebo byly aplikovány na volární předloktí levé ruky, ve vzdálenosti 5 cm, respektive 10 cm distálně od loketní jamky v množství 2 mg/cm².

Měření byla prováděna 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h a 6 h po aplikaci testovaných vzorků.

Aplikace vzorků a intervaly měření - opakovaná aplikace

Místa aplikace a aplikované množství bylo shodné jako v případě jednorázové aplikace.

Měření a opakovaná aplikace byla prováděna podle následujícího schématu:

Den 1: aplikace vzorků, měření hydratace 1 h a 5 h po aplikaci

Den 2: měření hydratace před aplikací vzorků; aplikace vzorků; měření hydratace 5 h po aplikaci; aplikace vzorků;

Den 3: měření hydratace před aplikací vzorků; aplikace vzorků; měření hydratace 5 h po aplikaci; aplikace vzorků;

Den 4: měření hydratace před aplikací vzorků; aplikace vzorků; měření hydratace 5 h po aplikaci; aplikace vzorků;

Den 5: měření hydratace před aplikací vzorků; aplikace vzorků; měření hydratace 5 h po aplikaci.

Instrumentální vyhodnocení stupně hydratace

Stupeň hydratace byl měřen pomocí přístroje Corneometer CM 820 (Courage + Khazaka). Hydratace pokožky byla hodnocena korneometricky na bázi změn hodnot dielektrické konstanty v závislosti na obsahu vody ve stratum corneum. Měření byla prováděna v souboru 30 osob, v klimatizované místnosti při standardní teplotě 21°C, relativní vlhkosti 45-50%, aklimatizace osob 15 minut před měřením.

Vyhodnocení výsledků

Stupeň hydratace byl klasifikován v procentech jako odchylka hodnoty aktuálního měření vzorku od aktuální hodnoty placeba, které sloužilo jako kontrola.

Porovnání průměrných hodnot hydratace v jednotlivých intervalech odečtu mezi jednotlivými místy aplikace a jednotlivými testovanými vzorky bylo provedeno

metodou analýzy rozptylu ANOVA. Statisticky významné rozdíly byly porovnány testy mnohonásobného porovnání metodou LSD (Least Significant Difference).

6.2.5. Ochranné účinky rostlinných extraktů

Komerčně dostupné ingredience pro kosmetické prostředky Aloe Vera, Green Tea, Pronalen Sunlife, Pronalen Cereal, Pronalen Sensitive Skin, Chamomile byly dodány firmou Provital Francie (tab. č.9)

Komerční název	Specifikace	Název v seznamu přísad podle společné nomenklatury	Číslo CAS
Aloe Vera	Výtažek z listů aloe pravé	ALOE BARBADENSIS LEAF EXTRACT	85507-69-3 / 94349-62-9
Green Tea	Výtažek z listů zeleného čaje	CAMELLIA SINENSIS LEAF EXTRACT	84650-60-2
Pronalen Sunlife	Sladový výtažek	MALT EXTRACT	8002-48-0
Pronalen Cereal	Výtažek z klíčků pšenice obecné	TRITICUM VULGARE GERM EXTRACT	84012-44-2
Pronalen Sensitive Skin	Výtažek z listů bazalky posvátné (a) výtažek z plodů ostropestřce mariánského	OCIMUM SANCTUM LEAF EXTRACT (and) SILYBUM MARIANUM FRUIT EXTRACT	91845-35-1 84604-20-6
Chamomile	Výtažek z květů heřmánku pravého	CHAMOMILLA RECUTITA FLOWER EXTRACT	84082-60-0

Tabulka č.9: Specifikace testovaných vzorků rostlinných extraktů

6.2.5.1. Metody in vitro

6.2.5.1.1. Zkouška cytotoxicity 3T3 NRU

Zkouška cytotoxicity byla provedena dle standardního protokolu INVITTOX č.64 (<http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu>). Fibroblasty Balb/c 3T3 byly kultivovány v DMEM s bovinním sérem (10%), nasazeny do 96-ti jamkových destiček a exponovány po dobu 24 hodin SLS (SIGMA-ALDRICH Co., USA) rozpuštěnému v DMEM bez séra (koncentrace 1, 5, 10, 15, 20 µg/ml), a to jednak samotnému a dále v kombinaci s testovanými vzorky v jejich nejvyšší necytotoxické koncentraci. Příjem neutrální červeně, odpovídající životnosti buněk, byl detekován fluorimetricky

(Denley-Wellfluor reader, Velká Británie). Životnost buněčných kultur ovlivněných experimentálními vzorky byla vyjádřena jako procento životnosti kontrolní buněčné kultury (ovlivněné kultivačním médiem bez séra).

Ochranné účinky testovaných rostlinných ingrediencí byly definovány jako poměr životnosti: (SLS s testovanou látkou) / (SLS bez testované látky). Pro statistické hodnocení významnosti rozdílů životnosti kultury ovlivněné SLS a SLS v kombinaci se šesti testovanými vzorky byla použita analýza rozptylu se Šidákovou korekcí pro mnohonásobné srovnávání (hladina významnosti 0,05) (Hsu, 1996).

6.2.5.1.2. Modifikovaná zkouška dráždivosti na rekonstruovaném modelu lidské kůže

Ochranný účinek zkoušených aktivních ingrediencí proti SLS byl testován s využitím modifikované zkoušky dráždění kůže in vitro, zkouška pomocí modelu rekonstruované lidské epidermis (ES, 2008b) na kožních modelech EPI-200 (MatTek, USA).

Po pre-inkubaci tkání po dobu 1 hodiny (37°C, 5% CO₂), bylo na povrch tkání aplikováno 25 µl SLS (0,75% vodný roztok) nebo SLS v kombinaci s předem zjištěnými nejvyššími netoxickými koncentracemi testovaných aktivních ingrediencí. Po ukončení expozice (15 min.) byly tkáně jemně opláchnuty pufovaným roztokem (PBS), aby se odstranila rezidua testovaných vzorků. Tkáně byly poté inkubovány v čerstvém médiu dalších 42 hodin, opláchnuty PBS a přeneseny do destičky obsahující roztok MTT. Cytotoxicita, ve smyslu snížení životnosti tkání, byla vyjádřena jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenasy, která byla měřena kvantitativně jakožto produkce formazanu z MTT dle protokolu INVITTOX č. 17 (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>).

6.2.5.2. Metoda in vivo

Zkouška kožní iritace ve skupině dobrovolníků

Ochranný účinek zkoušených vzorků proti SLS byl testován následujícím způsobem:

roztok SLS (2%, 5% vodný roztok) a SLS v kombinaci s testovanými aktivními ingrediencemi (v koncentracích doporučených výrobcem pro kosmetické prostředky) byl aplikován pomocí semiokluzní náplasti (Curatest, Lohmann/Rauscher, Německo)

na horní část zad 15 zdravých dobrovolníků. Expoziční čas byl 4 hodiny (Nicholson a Willis, 1999). Vizuální odečet kožních reakcí byl proveden 30 min., 24 h a 48 h po odstranění testu. Kožní erytém byl hodnocen podle následující stupnice: 0 - žádný viditelný erytém, 0,5 - minimální nebo nejednoznačný erytém, 1 - slabé zarudnutí, tečkované a difúzní, 2 - mírné, homogenní zarudnutí, 3 - silné, homogenní zarudnutí, 4 - ohnivé zarudnutí (COLIPA, 1997). Skóre všech dobrovolníků v každém intervalu odečtu bylo sečteno a výsledek byl vydělen počtem dobrovolníků (Index kožní iritace, IKI).

Ochranný účinek byl vypočten jako rozdíl indexů kožní iritace: IKI (SLS a testovaná látka) - IKI (SLS). Významnost rozdílů mezi indexy kožní iritace byla statisticky zhodnocena pomocí analýzy rozptylu s následným Dunnettovým testem pro porovnání vůči kontrole (SLS) (Hsu, 1996).

6.3. Výsledky

6.3.1. Éterické oleje

6.3.1.1. Chromatografická analýza éterických olejů

Chromatografickou analýzou byla prokázána přítomnost fotoaktivních látek, jejichž zastoupení a hmotnostní koncentrace je uvedena v tabulce č. 10. Přehled identifikovaných aktivních složek éterických olejů je uveden v tabulce č. 11.

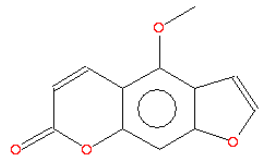
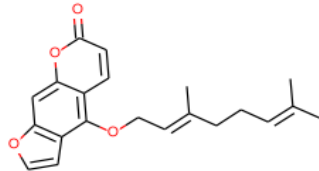
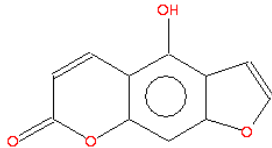
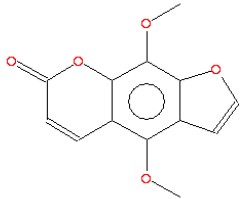
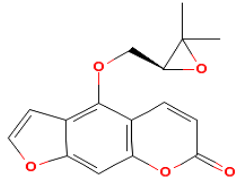
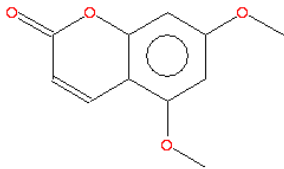
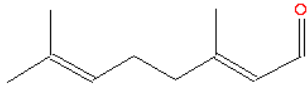
Bergamotové oleje dodavatelů Aroma a Biomedica neobsahovaly žádné fotoaktivní látky. U bergamotových olejů dodavatelů Sigma a Schupp byla zjištěna přítomnost neralu, geranialu a zejména bergaptenu, bergamotinu a bergaptolu.

Éterické oleje Litsea cubeba, pomeranč a citron od všech dodavatelů obsahovaly neral a geranial v různém množství, a to od koncentrací neralu 0,101% u pomeranče Aroma, po 29,689% u oleje Litsea cubeba Biomedica. Koncentrace geranialu byly zjištěny v koncentracích od 0,27% u pomeranče Aroma po 39,962% u éterického oleje Litsea cubeba Biomedica.

Další fotoaktivní látky, např. isopimpinelin a oxypeucedanin byly zjištěny ve stopových množstvích.

název / dodavatel	Neral	Geranial	Bergapten	Bergaptol	Bergamotin	Isopimpinelin	Citropten	Oxypeucedanin
Bergamot Aroma	---	---	---	---	---	---	---	---
Bergamot Biomedica	---	---	---	---	---	---	---	---
Bergamot Sigma	0,48	0,04	0,13	0,3	0,86	+	0,13	---
Bergamot Schupp	0,43	---	0,18	+	0,83		0,19	---
Litsea cubeba Aroma	21,837	30,775	---	---	---	---	---	---
Litsea cubeba Biomedica	29,689	39,962	---	---	---	---	---	---
Pomeranč Aroma	0,101	0,270	---	---	---	---	---	---
Pomeranč Eoné	0,115	0,293	---	---	---	---	---	---
Pomeranč bez terpenů Karl Hadek	0,447	0,875	---	---	---	---	---	---
Citron Aroma	1,796	4,060	---	---	---	---	---	---
Citron Eoné	1,945	3,236	---	---	---	---	---	+
Citron bez terpenů Karl Hadek	14,449	21,739	---	---	---	---	---	0,063

Tabulka č.10: Složení éterických olejů - hmotnostní koncentrace (%); méně než 0,01% - "+".

Název / synonyma	Název podle IUPAC	Struktura
Bergapten 5-methoxypsoralen 5-methoxy-6,7-furokumarin	4-methoxy-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]chromen-7-on	
Bergamotin 5-geranoxypsoralen Bergaptin	4-[[<i>(2E)</i> -3,7-dimethylokta-2,6-dien-1-yl]oxy]-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]chromen-7-on	
Bergaptol 5-hydroxypsoralen 5-hydroxyfurokumarin	4-hydroxy-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]chromen-7-on	
Isopimpinelin 5,8-dimethoxypsoralen 5,8-dimethoxy-6,7-furokumarin	4,9-dimethoxy-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]chromen-7-on	
Oxypeucedanin 5-(Isoamyloxy-2,3-epoxide)psoralen	4-[[<i>(2S)</i> -3,3-dimethyloxiran-2-yl]-methoxy]-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]chromen-7-on	
Citropten 5,7-dimethoxykumarin Citrapten Limetin	5,7-dimethoxy-2 <i>H</i> -chromen-2-on	
Citral cis,trans-citral geranial/neral	3,7-dimethylokta-2,6-dienal	

Tabulka č. 11: Složky éterických olejů

6.3.1.2. Test fototoxicity ve skupině dobrovolníků

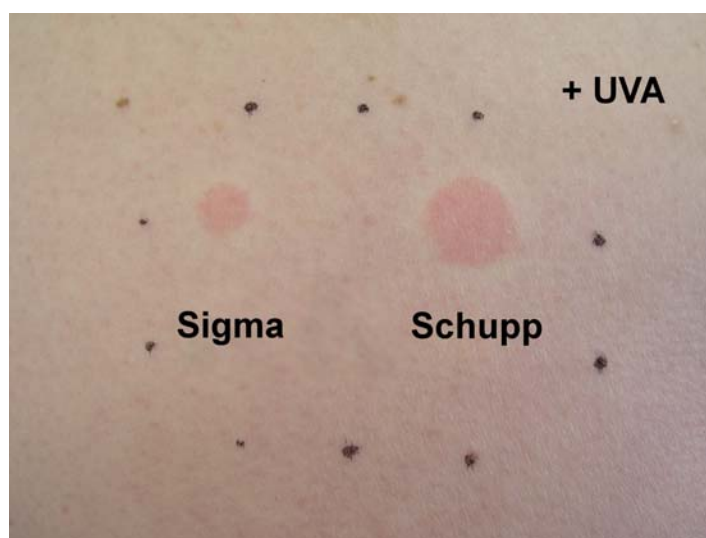
Nejvyšší nefototoxické / necytotoxické koncentrace jednotlivých olejů zjištěné ve zkoušce fototoxicity s využitím trojrozměrných rekonstruovaných modelů lidské kůže EpiDerm™ byly zvoleny pro zkoušku fototoxicity in vivo ve skupině dobrovolníků (Kejlová et al., 2007).

Výsledky fototoxicity bergamotových olejů v limitované skupině dobrovolníků jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Éterický olej / koncentrace	Intervaly odečtu počet pozitivních reakcí		
	24 h	48 h	72 h
Bergamot Aroma (1% ve vodě)	0/5	0/5	0/5
Bergamot Biomedica (1% ve vodě)	0/5	0/5	0/5
Bergamot Sigma (0,1% ve vodě)	5/5	5/5	5/5
Bergamot Schupp (0,0316% ve vodě)	5/5	5/5	5/5
Bergamot Aroma (1% v oleji)	0/5	0/5	0/5
Bergamot Biomedica (10% v oleji)	0/5	0/5	0/5
Bergamot Sigma (0,316% v oleji)	0/5	0/5	0/5
Bergamot Schupp (0,1% v oleji)	0/5	0/5	0/5

Tabulka č. 12: Fototoxicita bergamotových olejů ve skupině dobrovolníků

Fototoxické reakce byly zaznamenány v případě bergamotových olejů Sigma a Schupp, a to pouze v případě ředění těchto olejů ve vodě (obr.č.30).



Obrázek č. 30: Fototoxické reakce bergamotových olejů Sigma (0,1%) a Schupp (0,0316%), interval odečtu 24 h po ozáření

Výsledky fototoxicity citrusových éterických olejů v limitované skupině dobrovolníků jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Éterický olej koncentrace (řaděno ve vodě)	Intervaly odečtu počet pozitivních reakcí		
	24 h	48 h	72 h
Litsea cubeba Aroma (0,1%)	0/10	0/10	0/10
Litsea cubeba Biomedica (0,1%)	0/10	0/10	0/10
Pomeranč Aroma (1%)	6/10	6/10	4/10
Pomeranč Eoné (0,1%)	1/10	0/10	0/10
Pomeranč bez terpenů Karl Hadek (0,1%)	0/10	0/10	1/10
Citron Aroma (1%)	6/10 dráždí 5/10	5/10 dráždí 3/10	5/10 dráždí 3/10
Citron Eoné (0,1%)	2/10 dráždí 1/10	3/10	2/10
Citron bez terpenů Karl Hadek (0,1%)	1/10 dráždí 1/10	0/10	0/10

Tabulka č. 13: Fototoxicita citrusových olejů ve skupině dobrovolníků

Fototoxické reakce nebyly zaznamenány pouze u olejů Litsea cubeba od obou dodavatelů. V případě ostatních éterických olejů byly zaznamenány fototoxické reakce alespoň v jednom intervalu odečtu. U olejů citron Aroma, citron Eoné a citron bez terpenů Karl Hadek byly zjištěny i dráždivé reakce, tedy reakce v místě aplikace olejů bez přítomnosti UV záření.

V následující části studie byl pro éterické oleje se zaznamenanými fototoxickými / dráždivými reakcemi použit bezpečnostní faktor 10, což znamená, že oleje byly aplikovány v koncentracích 10 krát nižších než jsou koncentrace způsobující fototoxické / dráždivé reakce.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 14.

Éterický olej koncentrace (ředěno ve vodě)	Intervaly odečtu počet pozitivních reakcí		
	24 h	48 h	72 h
Pomeranč Aroma (0,1%)	0/10	0/10	0/10
Pomeranč Eoné (0,01%)	0/10	0/10	0/10
Pomeranč bez terpenů Karl Hadek (0,01%)	0/10	0/10	0/10
Citron Aroma (0,1%)	0/10	0/10	0/10
Citron Eoné (0,01%)	0/10	0/10	0/10
Citron bez terpenů Karl Hadek (0,01%)	0/10	0/10	0/10

Tabulka č. 14: Fototoxicita citrusových olejů ve skupině dobrovolníků - bezpečnostní faktor 10

V případě zařazení bezpečnostního faktoru 10, tedy použití koncentrací 10 krát nižších než jsou nejvyšší nefototoxické / necytotoxické koncentrace získané metodami in vitro s využitím trojrozměrných rekonstruovaných modelů lidské kůže EpiDerm™, nebyly zaznamenány žádné reakce.

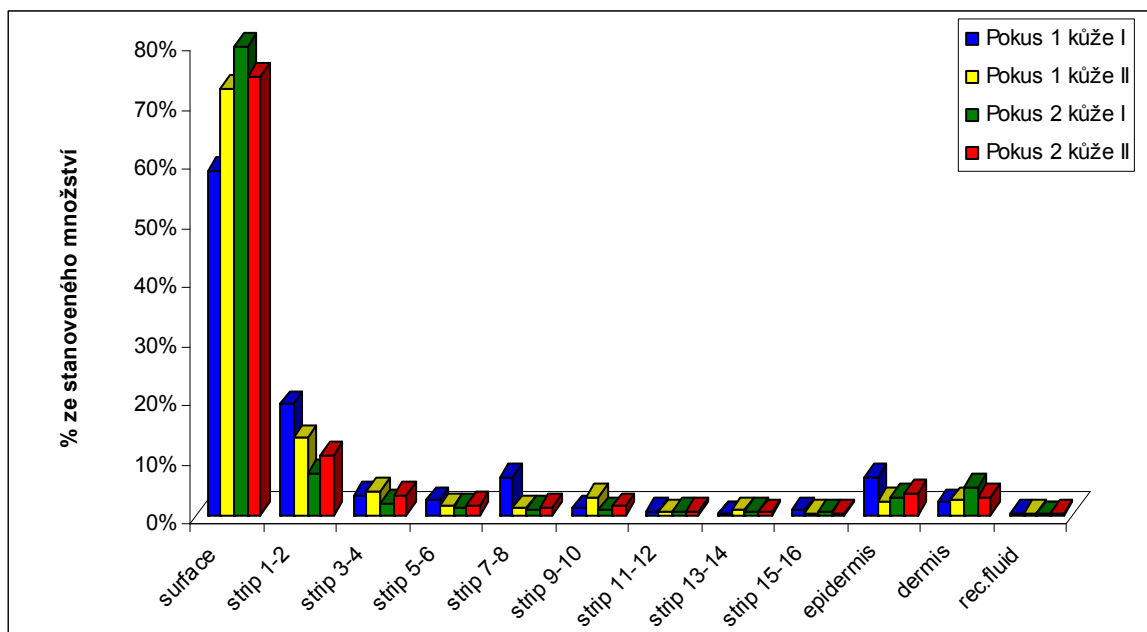
6.3.1.3. Penetrace éterických olejů

Zkouška penetrace byla provedena pro bergamotový olej (Schupp, Německo) se standardním přídatkem bergaptenu a pro citral (Aroma, Česká republika).

Výsledky jsou vyjádřeny v procentech jako poměr množství stanovené látky v jednotlivých vrstvách k celkovému stanovenému množství. Éterické oleje jsou vysoce těkavé látky, které, pokud nepenetrují do kůže, buď kondenzují na čepičce nebo zůstávají na povrchu kůže. Z tohoto důvodu byly hodnoty bergaptenu / citralu stanovené na povrchu čepičky a kůže sečteny a v grafu byly vyjádřeny jako hodnota pro "surface".

a) Penetrace bergamotového oleje - aplikace 1 hodina

Výsledky penetrace bergamotového oleje Schupp se standardním přídatkem bergaptenu jsou uvedeny v grafu č. 2.



Graf č.2: Penetrace bergamotového oleje - aplikace 1 hodina

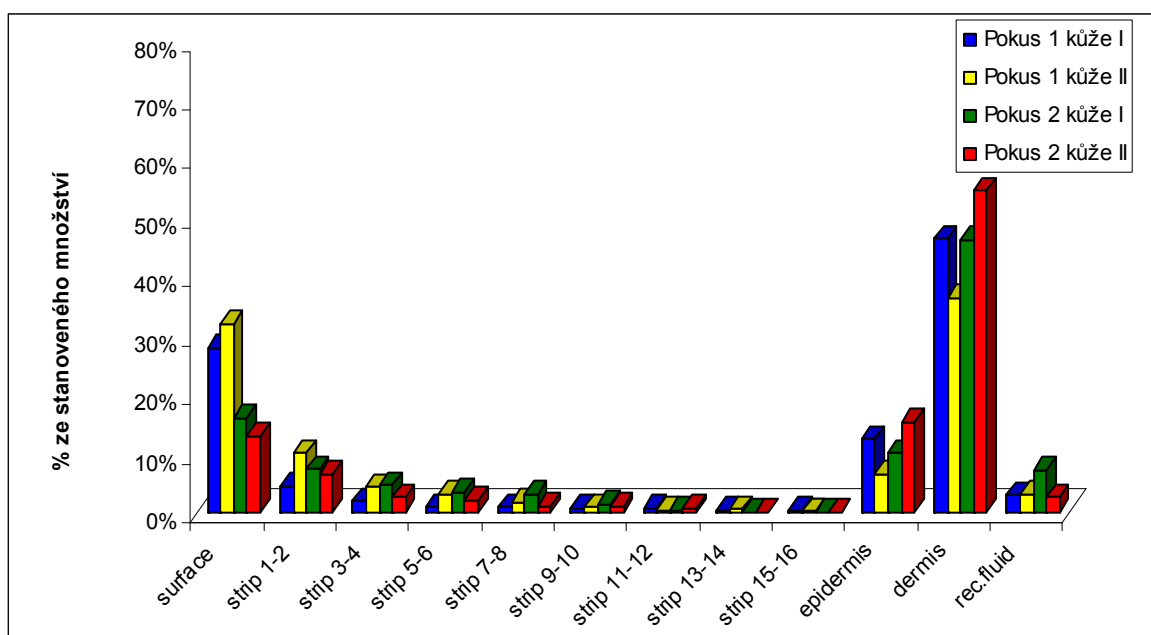
Po 1 hodinové aplikaci zůstává bergapten zejména na čepičce a povrchu kůže, a to v množství 58 - 79 %.

Ve stripech sejmutých z rohové vrstvy stratum corneum byl stanoven bergapten ve stripech 1-2 v množství 7 - 19 %, ve stripech 3-4 v množství 2 - 4 %, ve stripech 5-6 v množství 1 - 2 %, ve stripech 7-8 v množství 1 - 6 % ve stripech 9-10 v množství 1 - 3 %, v epidermis v množství 2 - 7 % a v dermis v množství 2 - 5 % bergaptenu. V ostatních stripech byla stanovena pouze stopová množství bergaptenu.

V recepční tekutině bergapten stanoven nebyl.

b) Penetrace bergamotového oleje - aplikace 24 hodin

Výsledky penetrace bergamotového oleje Schupp se standardním přídatkem bergaptenu jsou uvedeny v grafu č. 3.



Graf č. 3: Penetrace bergamotového oleje - aplikace 24 hodin

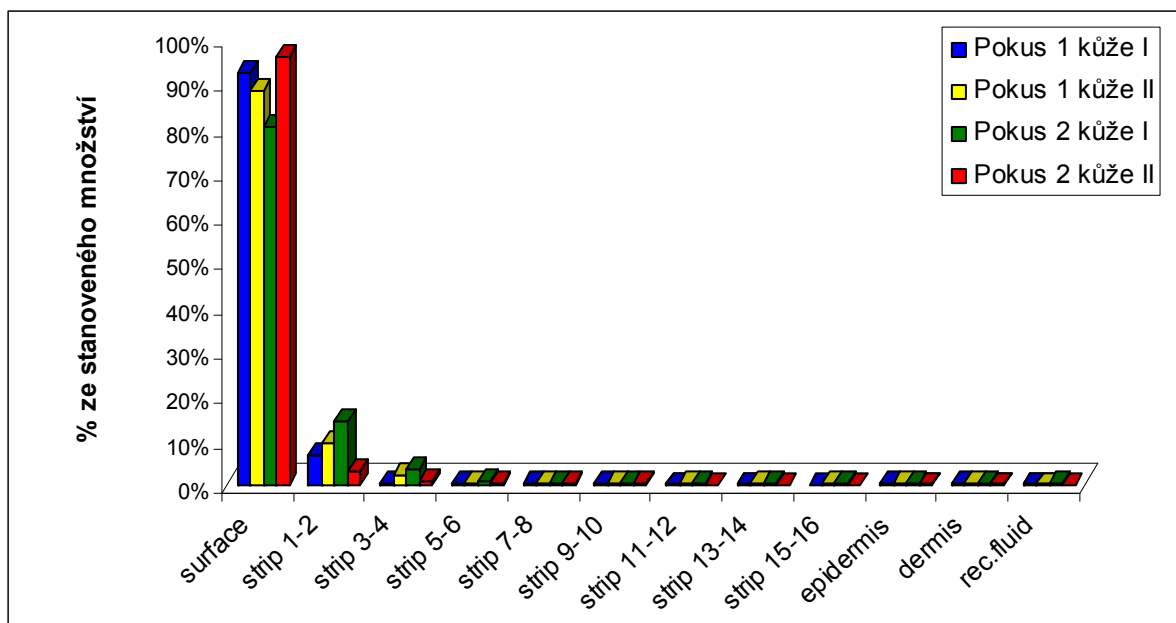
Po 24 hodinové aplikaci zůstává bergapten na čepičce a povrchu kůže v množství 13 - 28 %.

Ve stripech sejmutých z rohové vrstvy stratum corneum byl stanoven bergapten ve stripech 1-2 v množství 5 - 10 %, ve stripech 3-4 v množství 2 - 5 %, ve stripech 5-6 v množství 1 - 3 %, ve stripech 7-8 v množství 1 - 3 % ve stripech 9-10 v množství 1 %, v epidermis v množství 6 - 15 % a v dermis v množství 36 - 55 % bergaptenu, V ostatních stripech byla stanovena pouze stopová množství bergaptenu.

V recepční tekutině bylo stanoveno 3 - 7 % z celkového stanoveného množství bergaptenu.

c) Penetrace citralu - aplikace 1 hodina

Výsledky penetrace citralu jsou uvedeny v grafu č. 4.



Graf č.4: Penetrace citralu - aplikace 1 hodina

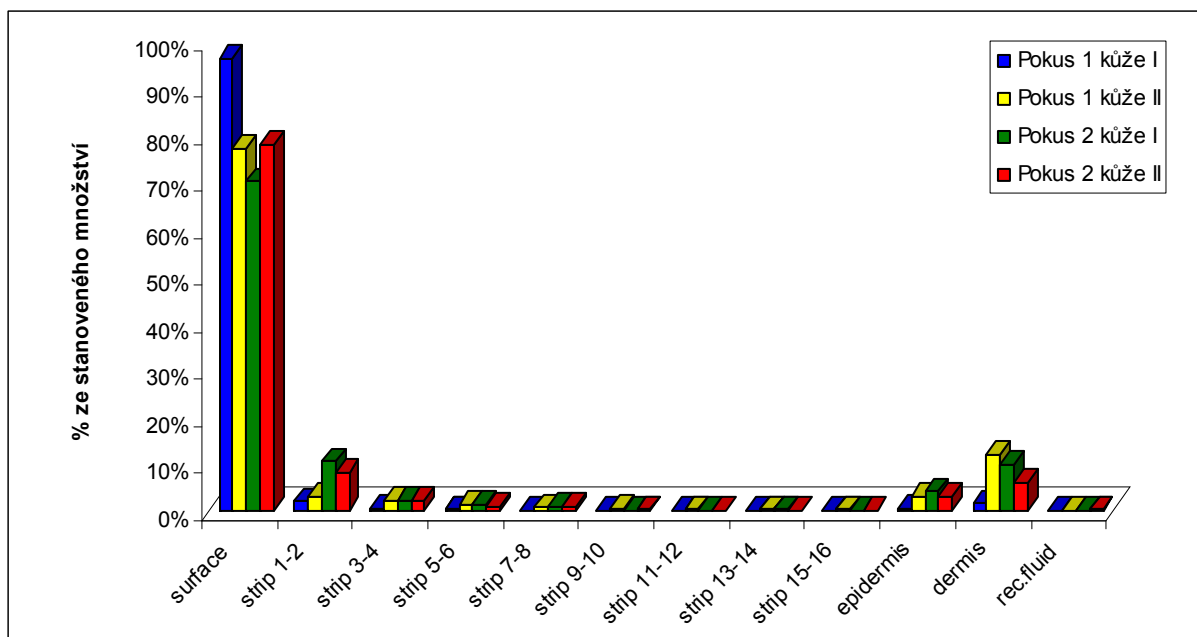
Po 1 hodinové aplikaci zůstává citral na čepičce a povrchu kůže v množství 80 - 96 %.

Ve stripech sejmutých z rohové vrstvy stratum corneum byl stanoven citral ve stripech 1-2 v množství 3 - 14 %, ve stripech 3-4 v množství 0 - 3 %. V ostatních stripech byla stanovena pouze stopová množství citralu.

V receptní tekutině citral stanoven nebyl.

b) Penetrace citralu - aplikace 24 hodin

Výsledky penetrace citralu jsou uvedeny v grafu č. 5.



Graf č.5: Penetrace citralu - aplikace 24 hodin

Po 24 hodinové aplikaci zůstává citral na čepičce a povrchu kůže v množství 70 - 96 % z celkového stanoveného obsahu citralu.

Ve stripech sejmutých z rohové vrstvy stratum corneum byl stanoven citral ve stripech 1-2 v množství 2 - 10 %. V ostatních stripech byla stanovena pouze stopová množství citralu. V epidermis bylo stanoveno 0 - 4 % citralu a v dermis 2 - 12% citralu z celkového stanoveného množství.

V recepční tekutině citral stanoven nebyl.

6.3.1.4. Diskuse

V literatuře se uvádí, že některé látky klasifikované jako fototoxické ve zkoušce 3T3 NRU, nejsou fototoxické při aplikaci na kůži v nízkých koncentracích (Jones et al., 2003; Kandarova, 2006). Tato skutečnost je dáвана do souvislosti s jejich omezenou biologickou dostupností v kůži, tedy s jejich schopností penetrace/absorpce do kůže. Biologická dostupnost fototaktivní látky je pravděpodobně klíčový faktor pro rozvoj kožní reakce po ozáření (Jones et al., 2003; Liebsch et al., 2005). Rekonstruované trojrozměrné modely lidské kůže obsahující rohovou vrstvu disponují kožní bariérou stejnou jako lidská epidermis. Proto jsou navrženy jako doplňková metoda pro potvrzení pozitivních, případně nejednoznačných výsledků získaných zkouškou 3T3 NRU PT. Slouží rovněž pro

zkoušení látek, které v buněčné kultuře, z různých důvodů, zkoušet nelze. Trojrozměrné modely rekonstruované lidské kůže jsou vhodné pro testování látek a přípravků, které jsou aplikovány neředěné, s extrémním pH, případně jsou zapracované do formulací finálních výrobků v nízkých koncentracích (Liebsch et al., 2005).

Bergamotové éterické oleje obsahující fotoaktivní látky neral, geranial, bergapten, bergaptol bergamotin a citropten jsou fototoxické v testu in vivo ve skupině dobrovolníků i v případě, kdy je použita nejvyšší nefototoxická / necytotoxická koncentrace (ředěno ve vodě) zjištěná ve zkoušce fototoxicity s využitím trojrozměrných modelů kůže.

U citrusových olejů byly zaznamenány fototoxické / iritační reakce u olejů obsahujících fototaktivní láky neral a geranial, v případě použitých nejvyšších nefototoxických / necytotoxických koncentrací zjištěných ve zkoušce fototoxicity s využitím trojrozměrných modelů kůže.

V případě použití bezpečnostního faktoru 10, tedy aplikace olejů v koncentracích 10 krát nižších než je nejvyšší nefototoxická / necytotoxická koncentrace získané ze zkoušek s využitím trojrozměrných modelů kůže, žádné ze zkoušených éterických olejů fototoxické nejsou.

Výjimku tvoří oleje získané z rostliny Litsea cubeba od výrobců Aroma a Biomedica s vysokým obsahem neralu a geranialu, které jsou klasifikovány jako fototoxické ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU PT. Ve zkoušce fototoxicity s využitím trojrozměrného modelu kůže a ve zkoušce fototoxicity ve skupině dobrovolníků jejich fototoxicita nebyla potvrzena. Je pravděpodobné, že díky složení olejů nedochází k penetraci fototaktivních složek a tudíž nejsou biologicky dostupné pro rozvoj fototoxické reakce.

Pokud zkouška fototoxicity 3T3 NRU poskytuje nejednoznačné nebo hraniční výsledky, měla by být hodnocená látka zkoušena na trojrozměrných modelech lidské kůže a výsledky by měly být ověřeny v klinické studii s použitím bezpečnostního faktoru 10, tedy zkoušení koncentrací 10 krát nižších než je nejvyšší fototoxická/cytotoxická koncentrace hodnocené látky metodami in vitro.

Při zkoušce penetrace bergamotového oleje obohaceného bergaptenem bylo po 1 hodinové aplikaci zjištěno nejvyšší množství bergaptenu na povrchu kůže a čepičky, a to v množství 58 - 79 %. Bergapten byl stanoven nejen ve stripech ze stratum corneum, ale v množství 2 - 5 % i v dermis, čímž je splněn předpoklad

biologické dostupnosti fotoaktivní látky nezbytné pro rozvoj fototoxické reakce. Při 24 hodinové aplikaci penetruje bergapten do dermis v množství 36 - 55 % a do recepční tekutiny v množství 3 - 7%

Citral při 1 hodinové aplikaci zůstává v 80 - 96 % stanoveného množství na povrchu kůže a v penetruje do úrovně stripu 1-2 ze stratum corneum v množství 3 - 14 % a do úrovně stripu 3-4 ve stopových množstvích. Po 24 hodinové aplikaci na povrchu kůže zůstává 70 - 96 % z celkového stanoveného množství, do dermis penetruje 0 - 4 % citralu a v recepční tekutině citral stanoven nebyl.

Při zkoušce fototoxicity in vivo ve skupině dobrovolníků je zkoušená látka aplikovaná na 1 hodinu, proto výsledky kožní penetrace/absorpce po 1 hodinové aplikaci poskytují důležitou informaci pro odhad potenciálu fototoxicity zkoušené látky.

Již v roce 1940 byla studována kinetika esenciálních olejů a bylo prokázáno, že ve vydechovaném vzduchu se složky éterických olejů objevují v různých časových intervalech od aplikace esenciálních olejů na kůži. Některé se objevují ve vydechovaném vzduchu již po 20 minutách po aplikaci, např. terpentýn, α -pinen; po 20 - 40 minutách linalool a eugenol. Bergamot, anýz a citron jsou ve vydechovaném vzduchu po 40 - 60 minutách, citronela, levandule a geranium po 60-80 minutách a citral, peppermint a geraniol až po 100 - 120 minutách po aplikaci na kůži.

Penetrace / absorpce esenciální olejů a celkový absorbovaný obsah závisí na mnoha faktorech. Protože se jedná o vysoce těkavé látky, odpařují se bezprostředně po aplikaci na kůži. Množství, které penetruje do kůže je tedy podstatně menší než množství aplikované. Dalším faktorem, který se uplatňuje při penetraci látek, je jejich viskozita, látky s vyšší viskozitou penetrují pomaleji (Tisserand a Balacs, 1995).

Experimenty provedené v rámci této disertační práce potvrdily dynamickou penetraci fotoaktivních složek éterických olejů, zejména bergaptenu, v závislosti na čase expozice až do dermis a recepční tekutiny. Tato skutečnost dokumentuje biologickou dostupnost fotoaktivních látek a možnou systémovou expozici, která je důkazem pro přítomnost potenciálu fototoxicity / fotosenzibilizace.

Výsledky získané při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU PT jsou nezbytné pro hodnocení látek před jejich zapracováním do finálních formulací spotřebních výrobků. V případě nejednoznačných výsledků je nezbytné provést zkoušku fototoxicity s využitím trojrozměrných modelů kůže a potvrdit negativní výsledky zkouškou fototoxicity ve skupině dobrovolníků.

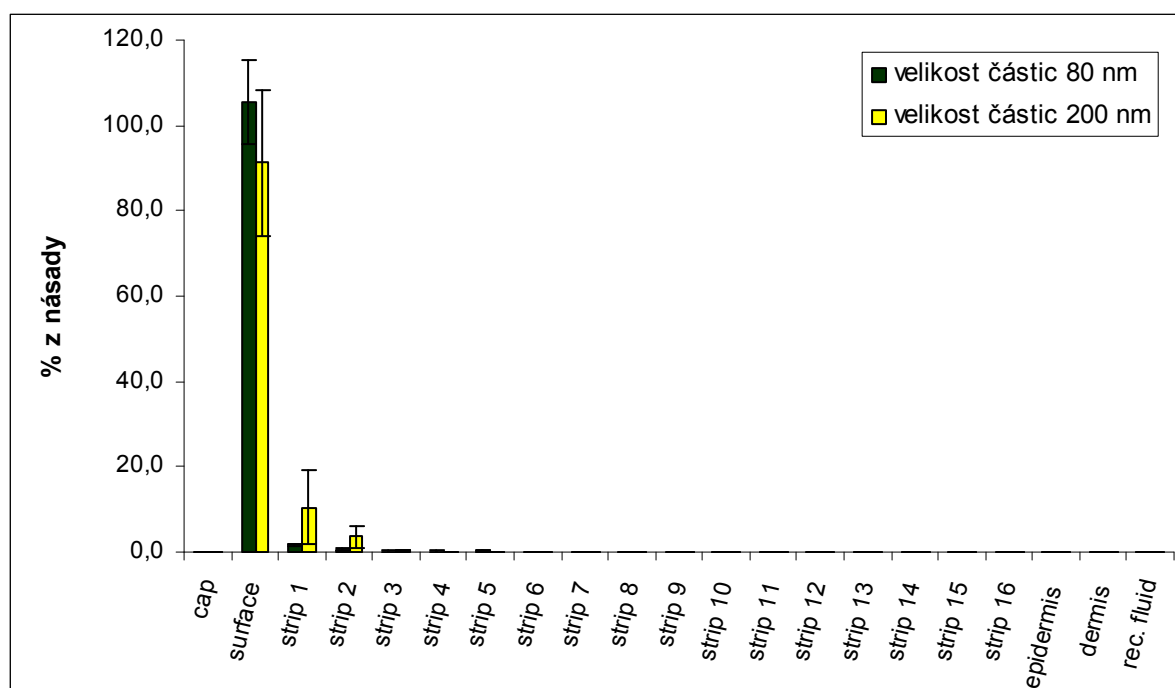
6.3.2. UV filtr Cosol E

6.3.2.1. Penetrace / absorpce Cosolu E

1) Aplikace na 3 paralelní kůže

a) Cosol E - 33%ní vodná disperze s průměrnou velikostí částic 80 nm a 200 nm

Výsledky penetrace Cosolu E s průměrnou velikostí částic 80 nm a 200 nm aplikovaného jako 33%ní vodná disperze na 3 paralelní kůže provedené ve dvou nezávislých pokusech jsou uvedeny v grafu č. 6. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z hodnot stanovených ve dvou pokusech.



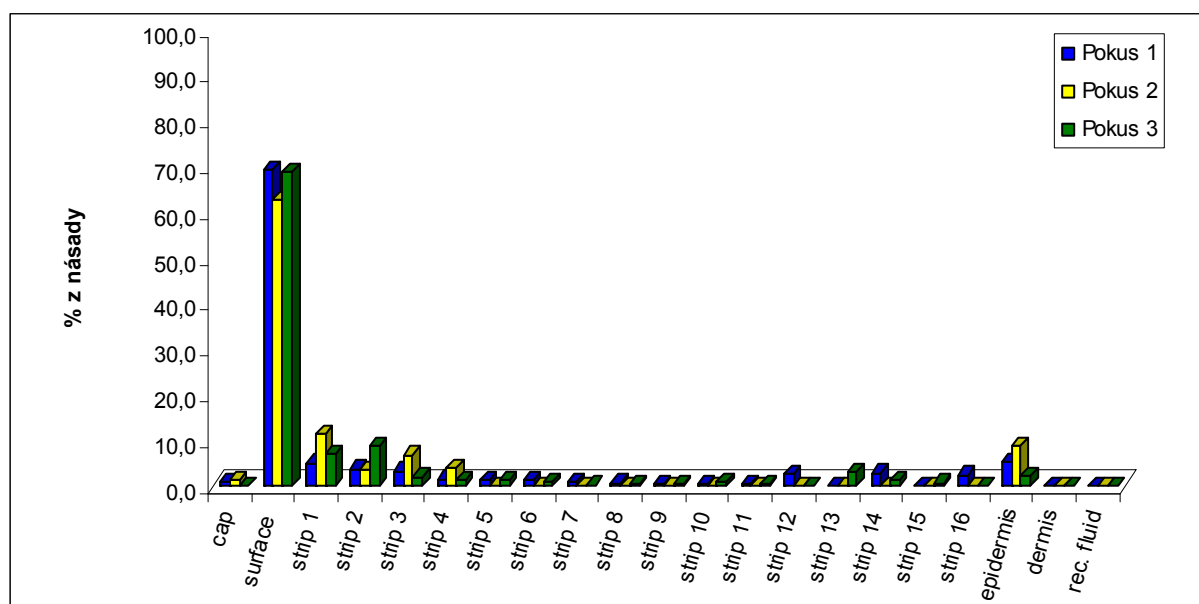
Graf č. 6: Penetrace Cosolu E s průměrnou velikostí částic 80 nm a 200 nm

V obou pokusech bylo zjištěno, že většina UV absorbéru zůstává na kožním povrchu, pouze část disperze s průměrnou velikostí částic 200 nm penetruje do úrovně stripů 1 a 2.

V epidermis, dermis a recepční tekutině nebyla přítomnost UV absorbéru zjištěna. Tyto výsledky platí pro disperzi s průměrnou velikostí částic 80 nm i 200 nm.

b) fotoprotektivní emulze s Cosolem E s průměrnou velikostí částic 200 nm

Výsledky penetrace fotoprotektivní emulze s průměrnou velikostí částic Cosolu E 200 nm jsou uvedeny v grafu č. 7.



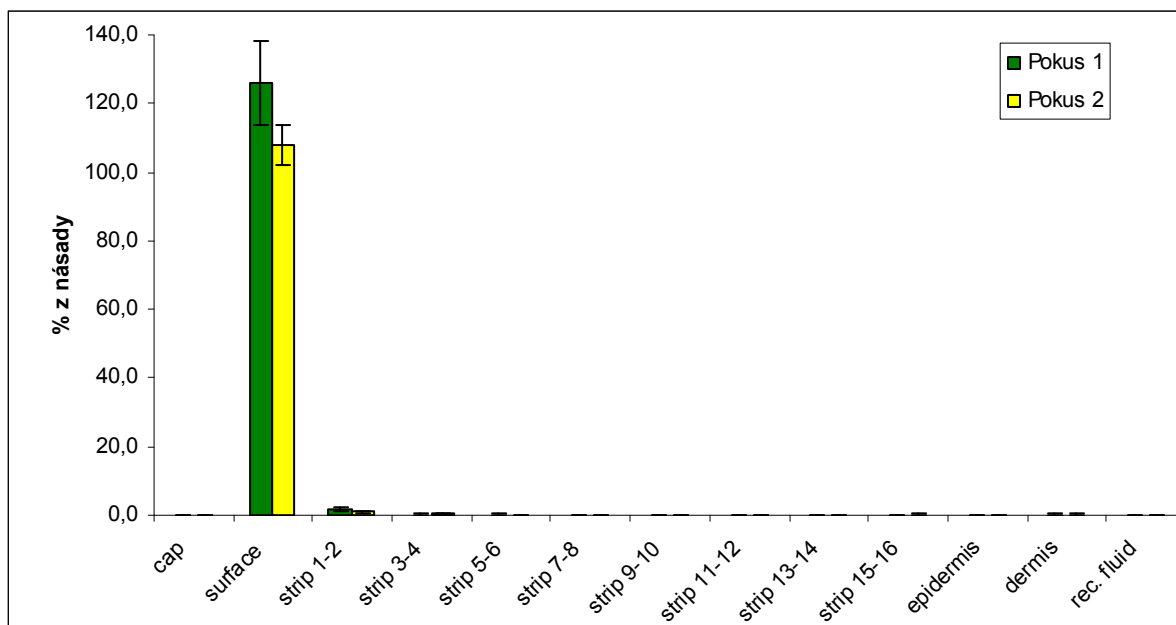
Graf č. 7: Penetrace fotoprotektivní emulze s průměrnou velikostí částic 200 nm.

Po zpracování Cosolu E s průměrnou velikostí částic 200 nm do receptury fotoprotektivní emulze zůstává Cosol E na povrchu kůže v množství 63 - 69 %, ve stripech 1-4 bylo analyzováno 1,3 - 11 % Cosolu E. V ostatních stripech byla zjištěna stopová množství Cosolu E. Cosol E ve fotoprotektivní emulzi penetruje až do epidermis, a to v množství 2,2 - 8 %. V dermis a recepční tekutině Cosole E stanoven nebyl.

2) Aplikace na 2 paralelní kůže

a) Cosol E - 33%ní vodná disperze s průměrnou velikostí částic 80 nm

Výsledky penetrace Cosolu E s průměrnou velikostí částic 80 nm aplikovaného jako 33%ní vodná disperze provedené ve dvou nezávislých pokusech v každém na 2 kůžích jsou uvedeny v grafu č. 8. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z hodnot stanovených ve dvou pokusech.

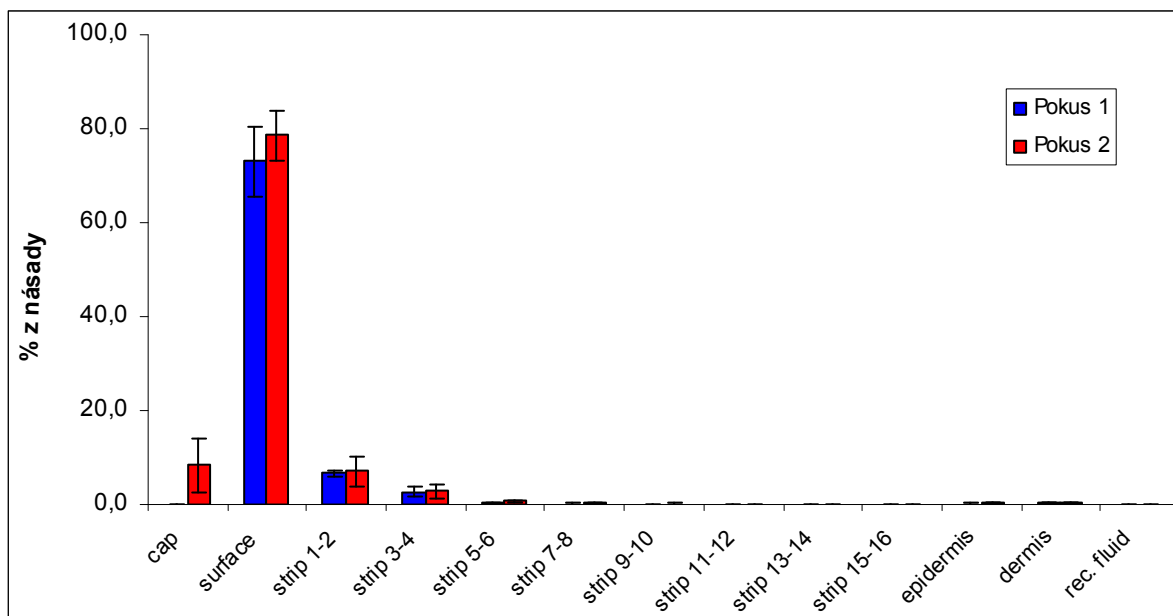


Graf č. 8: Penetrace Cosolu E s průměrnou velikostí částic 80 nm

Disperze Cosolu E s průměrnou velikostí částic 80 nm zůstává na povrchu kůže. Ve stripech 1-2 a 3-4 byla zjištěna pouze stopová množství. V epidermis, dermis a recepční tekutině Cosol E analyzován nebyl.

b) Cosol E - 33%ní vodná disperze s průměrnou velikostí částic 200 nm

Výsledky penetrace Cosolu E s průměrnou velikostí částic 200 nm aplikovaného jako 33%ní vodná disperze provedené ve dvou nezávislých pokusech v každém na 2 kůžích jsou uvedeny v grafu č. 9. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z hodnot stanovených ve dvou pokusech.



Graf č. 9: Penetrace Cosolu E s průměrnou velikostí částic 200 nm

Disperze Cosolu E s průměrnou velikostí částic 200 nm zůstává převážně na povrchu kůže, a to v množství 73 - 78 %. Tato disperze penetruje do stratum corneum do úrovně stripů 1-2 v množství 6,7 - 7,1 % a stripů 3-4 v množství 2,7 - 2,9 %. V epidermis a dermis byla zjištěna množství Cosolu E v hodnotách 0,1 - 0,6 %.

Stanovené hodnoty Cosolu E vyšší než 100 % z násady mohou být způsobeny nedostatečným ředěním vzorků při analýze. Při vysokých absorbancích poskytuje spektrofotometr vyšší údaje. U stanovené koncentrace 0,1% z násady je měření na hranici přesnosti a zjištěné hodnoty mohou být hodnoceny jako experimentální chyba.

6.3.2.2. Stanovení SPF u fotoprotektivních emulzí

Zaznamenané hodnoty individuálních SPF pro jednotlivé fotoprotektivní emulze a standard P2 jsou uvedeny v tabulkách č 15 - 19.

SPF TEST Result Table						
	Measured Data		Results			
n	MEDui	MEDpi	SPFi			
[-]	[mJ/cm ²]	[mJ/cm ²]	[-]			
1	33	328	9,9		SPF[-] =	11,0
2	26	263	10,1		Sn [-] =	1,3
3	26	263	10,1		Cn [-] =	0,73
4	21	263	12,5		Cl [%] =	6,6
5	33	328	9,9		n [-] =	14
6	26	263	10,1			
7	21	263	12,5		Valuable for n>=4	
8	26	328	12,6			
9	21	210	10,0			
10	26	328	12,6			
11	26	263	10,1			
12	26	263	10,1			
13	26	328	12,6			
14	21	210	10,0			

Tabulka č. 15: Fotoprotektivní emulzní prostředek s SPF 10 - Raw Data

SPF TEST Result Table						
	Measured Data		Results			
n	MEDui	MEDpi	SPFi			
[-]	[mJ/cm ²]	[mJ/cm ²]	[-]			
1	26	711	27,3		SPF[-] =	29,0
2	24	635	26,5		Sn [-] =	1,4
3	24	711	29,6		Cn [-] =	0,83
4	21	635	30,2		Cl [%] =	2,9
5	26	711	27,3		n [-] =	14
6	24	711	29,6			
7	21	635	30,2		Valuable for n>=4	
8	24	711	29,6			
9	21	635	30,2			
10	24	711	29,6			
11	24	635	26,5			
12	24	711	29,6			
13	24	711	29,6			
14	21	635	30,2			

Tabulka č. 16: Fotoprotektivní emulzní prostředek s SPF 25 - Raw Data

SPF TEST Result Table						
n	Measured Data		Results			
	MEDui	MEDpi	SPFi			
[-]	[mJ/cm ²]	[mJ/cm ²]	[-]			
1	26	843	32,4		SPF[-] =	34,4
2	24	843	35,1		Sn [-] =	1,7
3	24	753	31,4		Cn [-] =	0,98
4	21	753	35,9		Cl [%] =	2,9
5	26	843	32,4		n [-] =	14
6	24	843	35,1			
7	21	753	35,9		Valuable for n>=4	
8	24	843	35,1			
9	21	753	35,9			
10	24	843	35,1			
11	24	843	35,1			
12	24	753	31,4			
13	24	843	35,1			
14	21	753	35,9			

Tabulka č. 17: Fotoprotektivní emulzní prostředek s SPF 30 - Raw Data

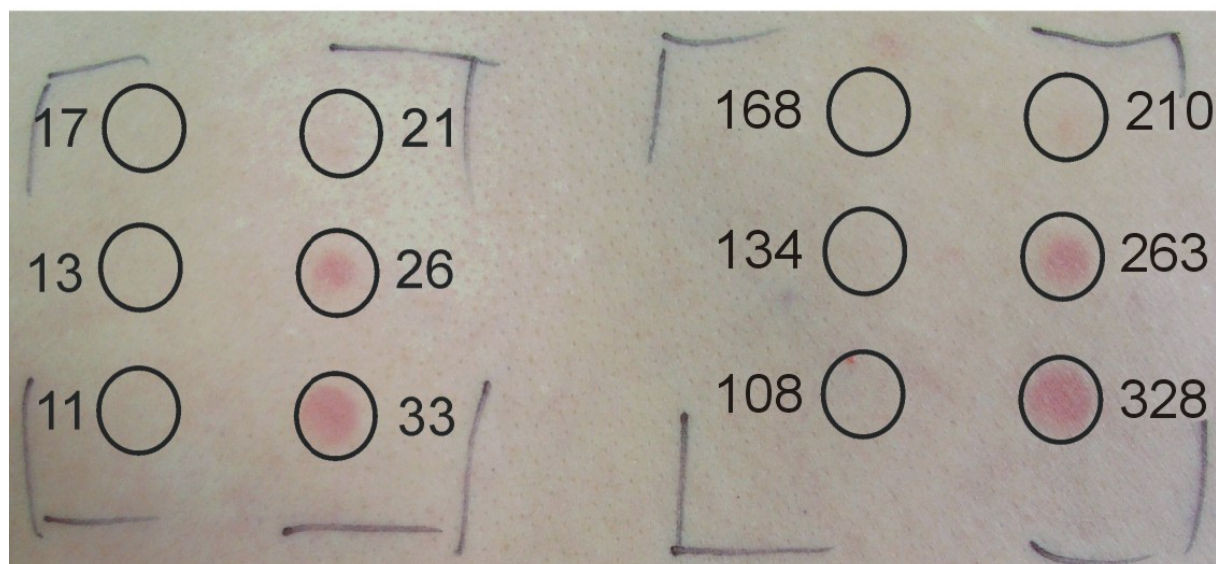
SPF TEST Result Table						
n	Measured Data		Results			
	MEDui	MEDpi	SPFi			
[-]	[mJ/cm ²]	[mJ/cm ²]	[-]			
1	26	1106	42,5		SPF[-] =	44,1
2	24	1106	46,1		Sn [-] =	3,4
3	24	988	41,2		Cn [-] =	1,93
4	21	988	47,0		Cl [%] =	4,4
5	26	1106	42,5		n [-] =	14
6	24	988	41,2			
7	21	882	42,0		Valuable for n>=4	
8	24	1106	46,1			
9	21	882	42,0			
10	24	1106	46,1			
11	24	988	41,2			
12	24	1106	46,1			
13	24	988	41,2			
14	21	1106	52,7			

Tabulka č. 18: Fotoprotektivní emulzní prostředek s SPF 40 - Raw Data

SPF TEST Result Table						
	Measured Data		Results			
n	MEDui	MEDpi	SPFi			
[-]	[mJ/cm ²]	[mJ/cm ²]	[-]			
1	33	525	15,9		SPF[-] =	16,1
2	26	420	16,2		Sn [-] =	1,4
3	26	420	16,2		Cn [-] =	0,81
4	21	336	16,0		CI [%] =	5,0
5	33	525	15,9		n [-] =	14
6	26	336	12,9			
7	21	336	16,0		Valuable for n>=4	
8	26	420	16,2			
9	21	336	16,0			
10	26	420	16,2			
11	26	420	16,2			
12	26	420	16,2			
13	26	420	16,2			
14	21	420	20,0			

Tabulka č. 19: Standard P2 - Raw Data

Příklad erytémových reakcí pro neošetřenou plochu ozářenou sérií dávek 11 - 33 mJ/cm² a pro plochu ošetřenou fotoprotektivní emulzí s předpokládaných SPF = 10 je uveden v obrázku č. 31.



Obrázek č.31: Minimální erytémová dávka pro neošetřenou kůži a kůži ošetřenou fotoprotektivní emulzí SPF 10

Minimální erytémová dávka (MED) způsobující viditelný erytém v místě expozice v intervalu odečtu 24 hodin po ozáření má pro neošetřenou kůži hodnotu 26 mJ/cm² a pro kůži ošetřenou fotoprotektivní emulzí SPF 10 má hodnotu 263 mJ/cm².

Výsledky stanovení SPF u fotoprotektivních emulzí ve skupině dobrovolníků jsou uvedeny v tabulce č. 20.

vzorek / SPF předpokládané	SPF stanovené	směrodatná odchylka	interval spolehlivosti
Emulze SPF 10	11,0	1,3	10,3 - 11,7
Emulze SPF 25	25,0	1,4	28,2 - 29,8
Emulze SPF 30	34,4	1,7	33,4 - 35,4
Emulze SPF 40	44,1	3,4	42,2 - 46,0
Standard P2 SPF 16,6	16,1	1,4	15,3 - 16,9

Tabulka č. 20: Výsledky stanovení SPF

6.3.2.3. Diskuse

Posuzování bezpečnosti nových ingrediencí před jejich zařazením do příslušných příloh Směrnice pro kosmetiku 76/768/EHS provádí na základě předložených toxikologických studií Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele. Součástí toxikologických studií jsou i údaje o penetraci/absorpci látek (Rogiers a Pauwels, 2008).

Při zkoušce penetrace disperze Cosolu E s průměrnou velikostí částic 200 nm aplikované na 3 paralelní kůže dochází k penetraci disperze do stratum corneum do úrovně stripů 1 a 2. Cosol E s průměrnou velikostí částic 200 nm penetruje do stratum corneum do úrovně stripů 3-4. Disperze Cosolu E s průměrnou velikostí částic 80 nm zůstává na povrchu kůže v případě obou použitých postupů.

Zkouška penetrace disperze Cosolu E s průměrnou velikostí částic 200 nm zapracované do fotoprotektivní emulze prokázala penetraci filtru do epidermis ve všech třech nezávislých pokusech.

Složení emulze ovlivňuje penetraci jednotlivých látek v závislosti na jejich chemických vlastnostech. Přítomnost lipidových složek napomáhá k průniku látek

obsažených v receptuře výrobku, včetně UV filtru, do epidermis. Dermální penetrace/absorpce chemických látek, tedy i ingrediencí používaných v kosmetických prostředcích, by neměla být prováděna pro jednotlivé látky, ale pro modelovou recepturu finálního výrobku (Zhai a Maibach, 2004).

Stanovení SPF u fotoprotektivních emulzí se zapracovaným Cosolem E prokázalo vysokou účinnost nově vyvinutého UV filtru proti UVB složce slunečního záření. Na účinnost proti UVA složce záření lze usuzovat z absorpčního spektra, které má dvě charakteristické absorpční vlny s maximy při 300 nm a 340 nm. Vlastní stanovení výše ochrany proti UVA složce slunečního záření nebylo doposud provedeno.

Zvyšující se znalosti o škodlivých účincích slunečního záření, zejména jeho ultrafialové složky, vedou k požadavku zvýšení účinku topicky aplikovaných prostředků ke slunění. Zjištění, že UVA složka záření může zvyšovat škodlivý účinek UVB složky záření, vede k požadavku zajištění ochrany proti UVA ve výši 1/3 celkového ochranného slunečního faktoru (SPF) (EK, 2006).

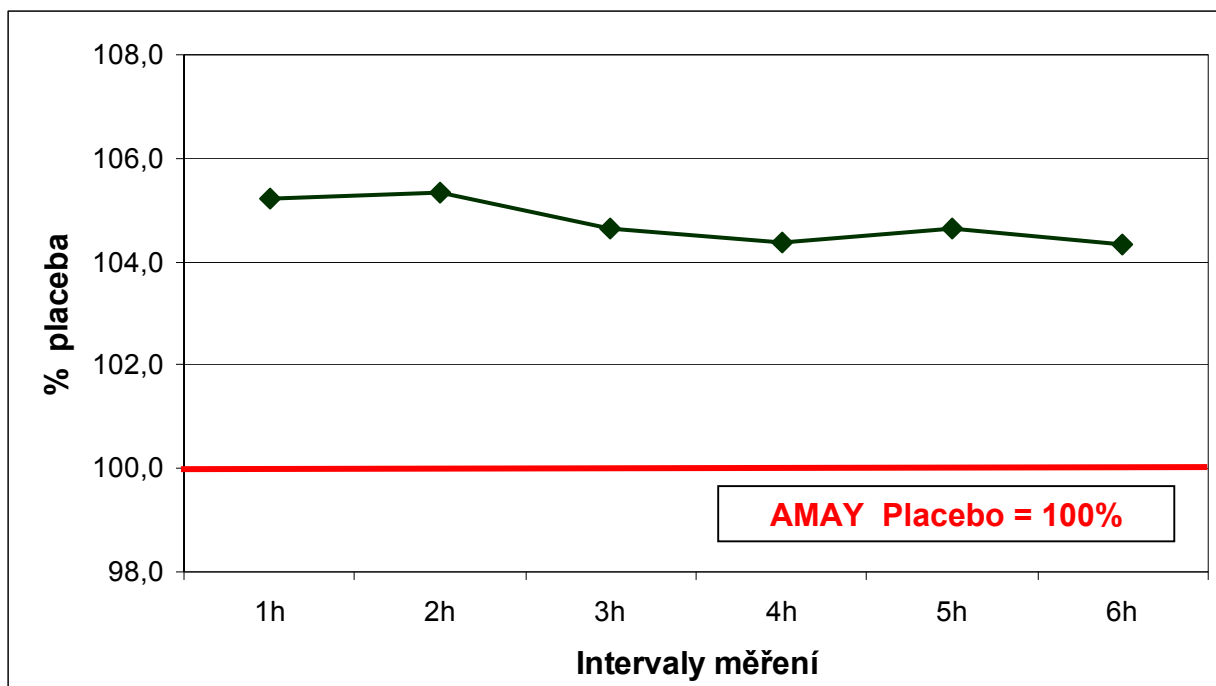
V recepturách kosmetických prostředků mohou být použity jako filtry ultrafialového záření pouze látky uvedené ve vyhlášce č. 448/2009, Příloha č. VII. Většina látek zde uvedených chrání před UVB, jen část před UVA složkou záření. Pro zajištění předpokládané ochrany před UVA i UVB zářením se používá kombinace obou typů filtrů. Používání fotostabilních širokopásmových filtrů působících v oblasti vlnových délek 290 - 400 nm vede ke snížení zátěže organismu chemickými látkami.

6.3.3. Stanovení hydratace

6.3.3.1. Stanovení hydratace výrobků Amay

6.3.3.1.1. AMAY Cream - jednorázová aplikace

Graf č.10 ukazuje hodnoty hydratace po jednorázové aplikaci výrobku s obsahem 0,5% Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder. Hodnoty hydratace testovaného vzorku s aktivní látkou byly porovnány s hodnotami kontrolního vzorku - placebo a byly vyjádřeny v %.

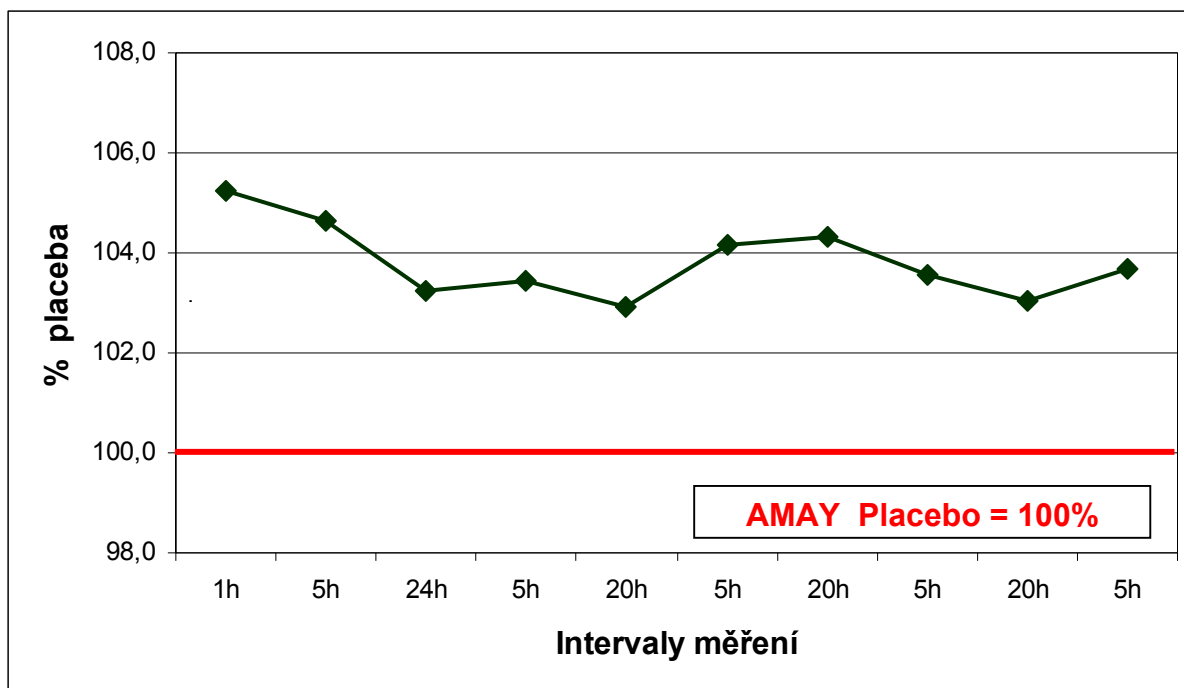


Graf č. 10: Hydratace kůže po jednorázové aplikaci AMAY Cream

Statistické vyhodnocení neprokázalo významné zvýšení hydratace po jednorázové aplikaci AMAY Cream s přidavkem aktivní látky ve formě prášku oproti AMAY placebo v žádném intervalu měření.

6.3.3.1.2. AMAY Cream - opakovaná aplikace

Graf č.11 ukazuje hodnoty hydratace po opakované aplikaci výrobku s obsahem 0,5% Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder. Hodnoty hydratace testovaného vzorku s aktivní látkou byly porovnány s hodnotami kontrolního vzorku - placebo a byly vyjádřeny v %.



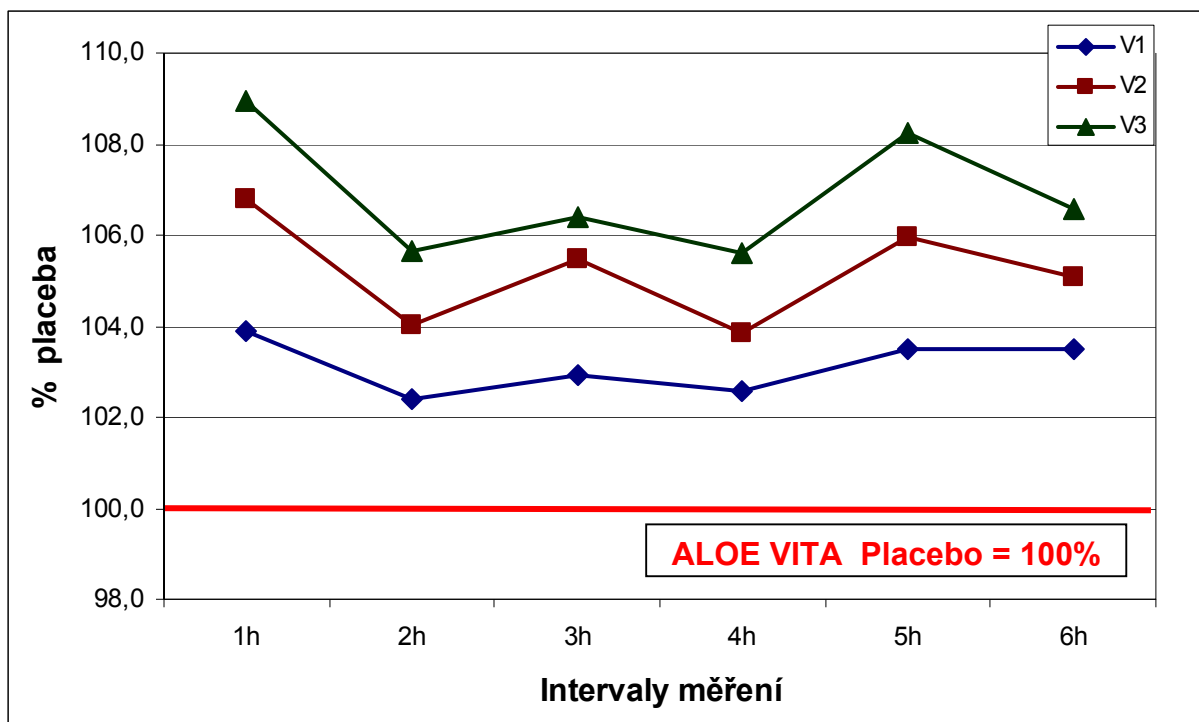
Graf č. 11: Hydratace kůže po opakované aplikaci AMAY Cream

Statistické vyhodnocení neprokázalo významné zvýšení hydratace ani po opakované aplikaci AMAY Cream s přidavkem aktivní látky ve formě oproti AMAY placebo v žádném intervalu měření.

6.3.3.2. Stanovení hydratace výrobků Aloe Vita

6.3.3.2.1. ALOE VITA Cream - jednorázová aplikace

Graf č.12 ukazuje hodnoty hydratace po jednorázové aplikaci výrobků s různým obsahem přírodní šťávy z listů, tj. Aloe Barbadensis Leaf Juice (koncentrace 11%, 23% a 36%) ve finálním výrobku. Hodnoty hydratace testovaných vzorků s aktivní látkou (přírodní šťáva z listů) byly porovnány s hodnotami kontrolního vzorku - ALOE VITA placebo a byly vyjádřeny v %.



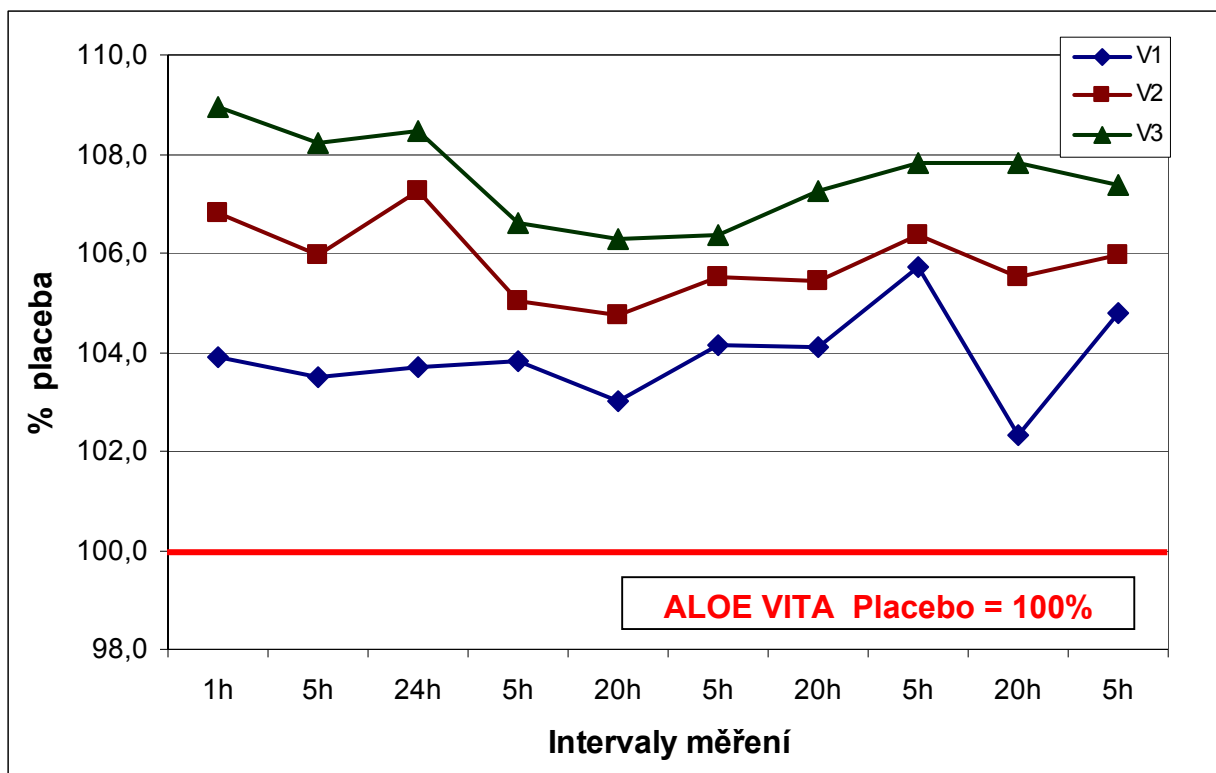
Graf č. 12: Hydratace kůže po jednorázové aplikaci ALOE VITA Cream.

V1 - obsah aloe juice 11%, V2 - obsah aloe juice 23%, V3 - obsah aloe juice 36%

Statistické vyhodnocení neprokázalo významné zvýšení hydratace v případě jednorázové aplikace ALOE VITA Cream s obsahem aloe juice 11% v žádném intervalu měření. V případě ALOE VITA Cream s obsahem aloe juice 23% statistické vyhodnocení prokázalo významné zvýšení hydratace v intervalu měření 1 h, 3 h a 5 h po jednorázové aplikaci. Po aplikaci ALOE VITA Cream s obsahem aloe juice 36% prokázalo statistické vyhodnocení významné zvýšení hydratace v intervalu měření 1 h, 2h, 3 h, 5 h a 6 h po aplikaci.

6.3.3.2.2. ALOE VITA Cream - opakovaná aplikace

Graf č.13 ukazuje hodnoty hydratace po opakované aplikaci výrobků s různým obsahem Aloe Barbadensis Leaf Juice (koncentrace 11%, 23% a 36%) ve finálním výrobku. Hodnoty hydratace testovaných vzorků s aktivní látkou byly porovnány s hodnotami kontrolního vzorku - ALOE VITA placebo a byly vyjádřeny v %.



Graf č. 13: Hydratace kůže po opakované aplikaci ALOE VITA Cream.

V1 - obsah aloe juice 11%, V2 - obsah aloe juice 23%, V3 - obsah aloe juice 36%

Statistické vyhodnocení prokázalo významné zvýšení hydratace kůže po opakované aplikaci ALOE VITA Cream s obsahem aloe juice 11% v intervalu měření 5 hodin po předposlední a 5 hodin po poslední aplikaci. Pro ALOE VITA Cream bylo statisticky významné zvýšení hydratace kůže navozeno ve většině intervalů měření. Statisticky významné zvýšení hydratace kůže po opakované aplikaci ALOE VITA Cream s 36% aloe juice bylo prokázáno ve všech intervalech měření.

6.3.3.3. Diskuse

Zdravá kůže obsahuje ze své celkové hmotnosti přibližně 70% vody. Ve stratum corneum je obsaženo 10 - 15 % vody a za dehydrataci se považuje stav, kdy obsah vody ve stratum corneum poklesne pod 10% (Batt a Fairhurst, 1986). Hydratace závisí na rovnováze mezi přísunem a ztrátou vody. Jakékoli porušení rovnováhy mezi přísunem vody a její ztrátou se bezprostředně projeví v epidermis. Pokud je vrstva stratum corneum dehydratovaná, kůže zhrubne a ztvrdne a tento

proces je doprovázen tvorbou drobných vrásek. Tento proces je doprovázen svěděním a šupinatěním (Brod, 1991).

Používání vhodných kosmetických prostředků s obsahem zvlhčujících látek vede k obnovení obsahu vody ve stratum corneum. Nejčastěji používanými zvlhčujícími látkami v kosmetických prostředcích jsou například glycerin, urea, propylen glykol, kyselina hyaluronová a látky rostlinného původu. Jednou z nejčastěji používaných rostlin v kosmetických prostředcích je aloe vera, zejména pro své hydratační účinky.

Hydratační účinek ingrediencí na bázi aloe vera závisí na způsobu jejich výroby, na typu emulze, do které jsou zapracovány a v neposlední řadě i na zapracované koncentraci.

Ingredience ve formě prášku - Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder - byla zapracována do receptury kosmetického prostředku použité pro stanovení jejího hydratačního účinku v maximální možné koncentraci, a to 0,5%. Vyšší koncentraci této složky nebylo možné z technologických důvodů zapracovat, neboť podle zkušeností výrobce (ttz Bremerhaven, Německo) docházelo k rozpadu takto připravené emulze již do 2 dnů od výroby. Při použité koncentraci 0,5% Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder nebylo prokázáno statisticky významné zvýšení hydratace kůže oproti emulzi bez přítomnosti aktivní složky, a to ani po opakované aplikaci. Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder je ingredience získaná z aloe vera ve formě prášku, která nemá v recepturách kosmetických prostředků zásadní význam z hlediska hydratačních účinků.

Ingredience Aloe Barbadensis Leaf Juice, tj. přírodní šťáva z listů, byla zapracována do receptur kosmetických prostředků ve 3 různých koncentracích, a to 11%, 23% a 36% ve finálním výrobku. V koncentraci 11% ve finálním výrobku nebylo prokázáno statisticky významné zvýšení hydratace po jednorázové aplikaci, po opakované aplikaci došlo ke statisticky významnému zvýšení hydratace kůže až po několikanásobné aplikaci. Pouze koncentrace 36% Aloe Barbadensis Leaf Juice ve finálním výrobku vedla ke statisticky významnému zvýšení hydratace oproti emulzi bez přítomnosti aktivní látky po jednorázové i opakované aplikaci ve všech intervalech měření.

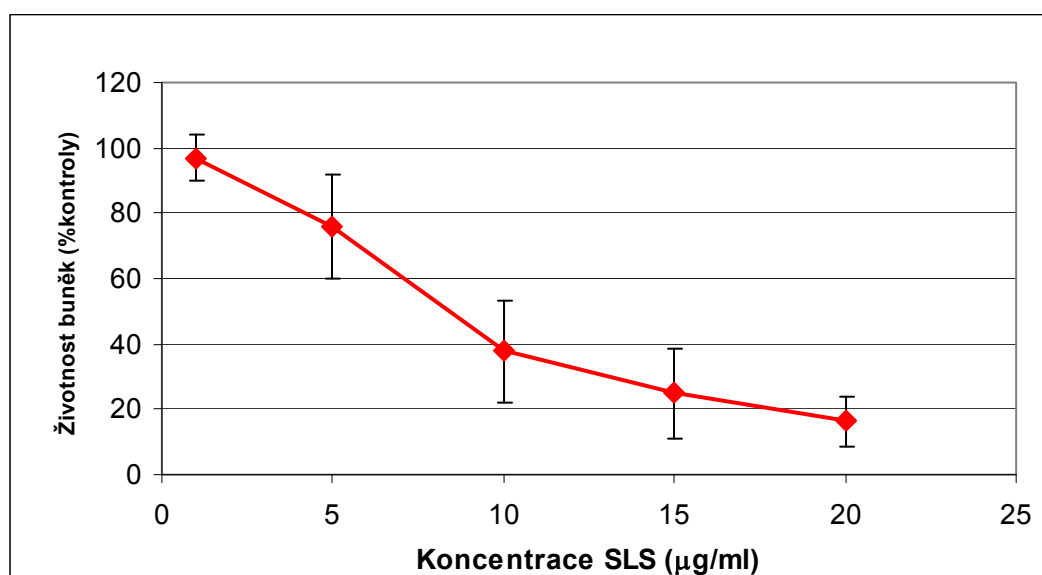
Průkaz účinků deklarovaných u kosmetických prostředků je jedním z předepsaných podkladů pro hodnocení bezpečnosti kosmetických prostředků a je nedílnou součástí povinné dokumentace (vyhl. č. 448/2009 Sb.). Výrobce, dovozce ani distributor nesmí při nabízení kosmetických prostředků k prodeji použít texty, názvy, obchodní značky, vyobrazení a symboly, které by výrobkům přisuzovaly vlastnosti, jež tyto výrobky nemají (z.č. 258/2000 Sb.).

Dobře hydratovaná kůže plní jednu ze svých nejdůležitějších funkcí, a to ochranu lidského organismu před vlivy zevního prostředí.

6.3.4. Stanovení ochranných účinků rostlinných extraktů

6.3.4.1. Cytotoxicita 3T3 NRU pro SLS

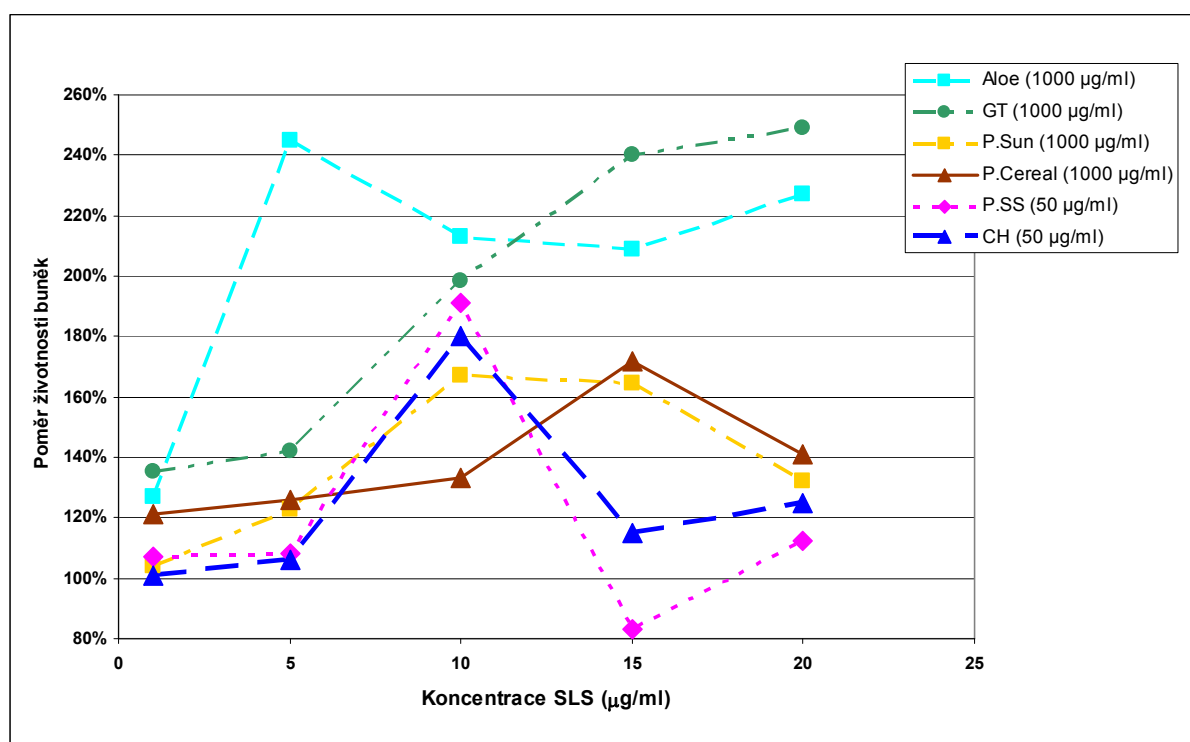
Graf č. 14 ukazuje hodnoty cytotoxicity SLS ve stoupající koncentraci, které byly získány z nezávislých opakování zkoušky cytotoxicity 3T3 NRU. Bylo určeno rozmezí necytotoxických až silně cytotoxických koncentrací a prahová, t.j. nejvyšší necytotoxická koncentrace, 5 mg/ml.



Graf č. 14: Cytotoxicita SLS (zkouška cytotoxicity 3T3 NRU) - každý bod reprezentuje průměrnou hodnotu životnosti získanou ve 14 nezávislých experimentech \pm SD.

6.3.4.2. Cytotoxicita 3T3 NRU účinnost aktivních látek

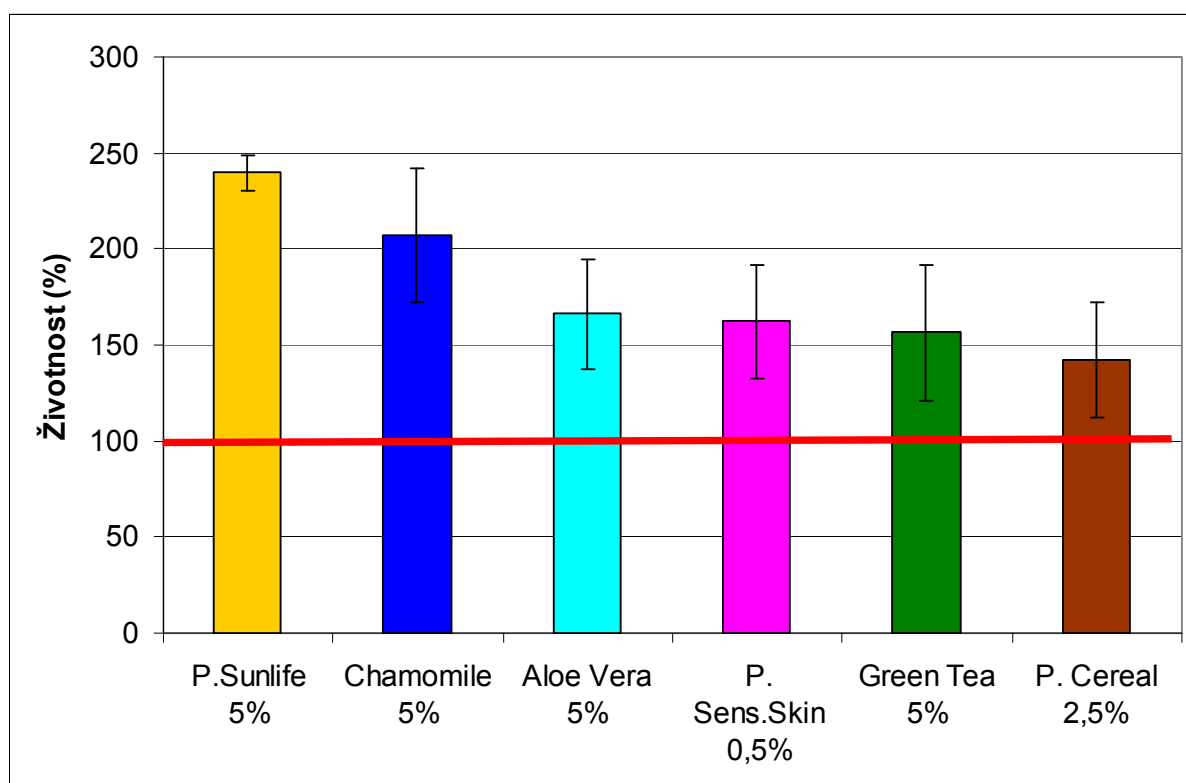
Účinky 6 rostlinných ingrediencí určených pro použití v kosmetických prostředcích jakožto ochranné látky byly nejprve zkoušeny v buněčné kultuře fibroblastů Balb/c 3T3. V určitých koncentracích všech testovaných látek bylo prokázáno statisticky významné zvýšení životnosti buněčné kultury po přidání rostlinných ingrediencí nad životnost buněčné kultury ovlivněné samotným SLS (100%). Výsledky jsou shrnuty v grafu č.15. Stupeň zvýšení životnosti buněčné kultury po přidání aktivních látek nebyl u všech ingrediencí shodný. Ochranný účinek byl nejvýraznější v rozsahu koncentrací SLS navozujících slabé až mírné cytotoxické účinky.



Graf č.15: Ochranné účinky aktivních látek proti cytotoxicitě SLS (zkouška cytotoxicity 3T3 NRU). Každý bod reprezentuje poměr životnosti buněčné kultury ovlivněné SLS v kombinaci s aktivní látkou ku životnosti buněčné kultury ovlivněné pouze SLS (3 nezávislé experimenty).

6.3.4.3. Modifikovaná zkouška dráždivosti na rekonstruovaném modelu lidské kůže - účinnost aktivních látek

Ochranné účinky aktivních látek proti toxicitě vyvolané 0,75% SLS byly následně hodnoceny s využitím trojrozměrných rekonstruovaných modelů lidské kůže EpiDerm. Výsledky uvedené v grafu č.16 ukazují zvýšení životnosti po aplikaci všech zkoušených látek, nejvýraznější zvýšení bylo zaznamenáno v případě Pronalen Sunlife 5% a Chamomile 5%.

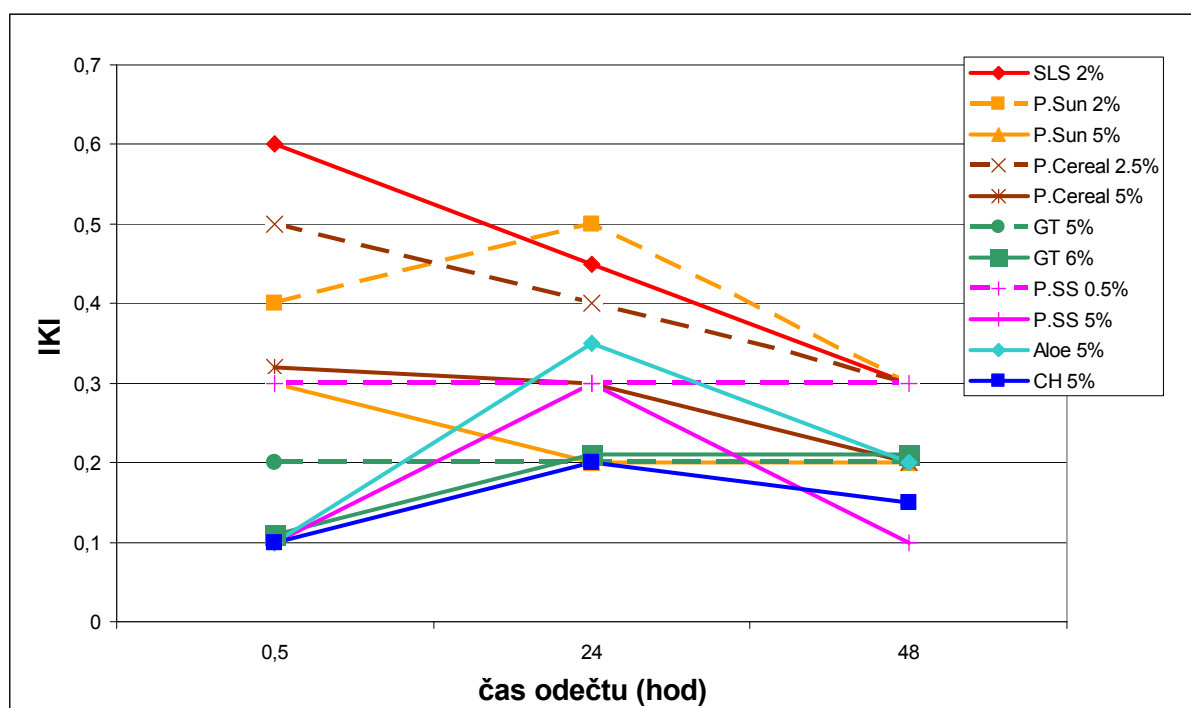


Graf č.16: Ochranné účinky rostlinných ingrediencí proti toxicitě vyvolané 0,75% SLS (rekonstruovaný model lidské kůže EpiDerm). Každý sloupec reprezentuje výsledek 2 nezávislých experimentů (průměr \pm SD).

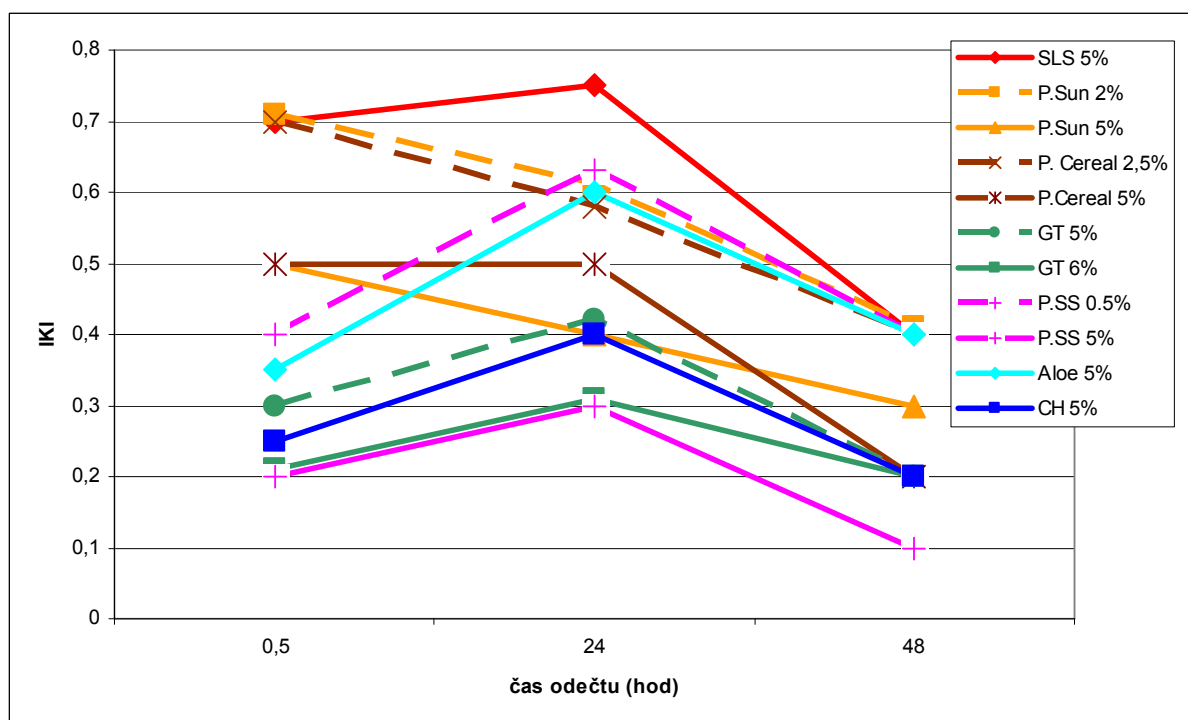
6.3.4.4. Zkouška ve skupině dobrovolníků - účinnost aktivních látek

Pro potvrzení biologických účinků aktivních ingrediencí získaných metodami in vitro byly provedeny 2 nezávislé zkoušky kožní iritace ve skupině dobrovolníků. Rozvoj iritace kůže navozené aplikací SLS v koncentraci 2% resp. 5% byl ovlivněn přidáním zkoušených látek a hodnocen v jednorázovém epikutánním testu.

Protektivní účinek aktivních ingrediencí se lišil v závislosti na koncentraci SLS i na koncentraci zkoušené látky. Signifikantní protektivní účinek proti iritaci navozené 2% SLS (graf č.17) ve všech intervalech odečtu byl prokázán u Green Tea 6%, Chamomile 5% a Pronalen Sensitive Skin 5%. V případě iritace navozené 5% SLS (graf č.18) byl statisticky významný ochranný účinek prokázán pro Green Tea 6% a Chamomile 5%. Ingredience Aloe Vera 5%, Green Tea 5%, Pronalen Sunlife 5% a Pronalen Cereal 5% navozovaly signifikantní ochranný účinek nepravidelně, byl identifikován pouze v některých intervalech odečtu. U nižších koncentrací Pronalen Sensitive Skin (0,5%), Pronalen Cereal (2,5%) a Pronalen Sunlife (2%) nebylo prokázáno významné snížení kožní iritace vyvolané 2% SLS resp. 5% SLS ve skupině dobrovolníků.



Graf č.17: Ochranné účinky rostlinných ingrediencí proti kožní iritaci vyvolané 2% SLS (uzavřený epikutánní test ve skupině dobrovolníků). Každý bod reprezentuje Index kožní iritace pro kombinaci času látky (průměrné skóre u 15 dobrovolníků).



Graf č.18: Ochranné účinky rostlinných ingrediencií proti kožní iritaci vyvolané 5% SLS (uzavřený epikutánní test ve skupině dobrovolníků). Každý bod reprezentuje Index kožní iritace pro kombinaci času a látky (průměrné skóre u 15 dobrovolníků).

6.3.4.5. Diskuse

Zkoušení kožní dráždivosti kosmetických ingrediencií na zvířatech je dle 7. dodatku Kosmetické směrnice 76/768/EHS (5) od 11.3.2009 již zakázáno. Metody in vitro se v současnosti stávají jediným zdrojem informace o možném riziku kožní iritace vyvolané novými ingrediencemi nebo finálními výrobky. V roce 2007 byla dokončena validační studie organizovaná Evropským centrem pro validaci alternativních metod (ECVAM), zaměřená na zkoušky kožní iritace využívající modely rekonstruované lidské kůže (Spielmann et al., 2007). Dnes jsou tyto modely předepsaným testem pro zkoušení kožní dráždivosti (ES, 2009).

Zkouška cytotoxicity v buněčné kultuře fibroblastů 3T3 Balb/c je rychlá a výhodná metoda pro účely screeningu umožňující nejenom zkoumat cytotoxické účinky na buňky a tkáně, ale také možné ochranné vlastnosti různých ingrediencií pro kosmetiku. Významné zvýšení životnosti buněk ovlivněných SLS díky přidání testovaných rostlinných ingrediencií bylo prokázáno u všech rostlinných extraktů alespoň u jedné z použitých koncentrací SLS. Tento výsledek byl potvrzen v případě

všech testovaných látek i v testu kožní iritace na modelu rekonstruované lidské kůže EpiDerm. Vzhledem k tomu, že tato metoda vyžaduje vyšší počet tkání EpiDerm pro prokázání významných účinků (Faller a Bracher, 2002) a je podstatně nákladnější než test na buněčné kultuře, je výhodné ji využít jako následný test pro látky, jejichž možné pozitivní účinky byly screeningově detekovány zkouškou cytotoxicity 3T3 NRU (Benassi et al., 1999).

Velmi přesvědčivé výsledky byly získány epikutánním testem ve skupině dobrovolníků. Většina testovaných látek významně snížila rozvoj erytému navozeného standardním tenzidem SLS. Extrakty Green Tea 6%, Chamomile 5% a Pronalen Sensitive Skin 5% prokázaly stabilní snížení kožní iritace ve všech intervalech vizuálního hodnocení. Ochranný účinek proti rozvoji erytému při podráždění kůže SLS je pravděpodobně způsoben stabilizací fyziologických parametrů kožní tkáně, antioxidačním účinkem spolu s vychytáváním toxických radikálů a podporou hydratace a regenerace (Zhai a Maibach, 1998; Zhai et al., 2000). Přidávání ochranných rostlinných přísad do tenzidových kosmetických prostředků nebo čisticích přípravků pro domácnost může významně přispět ke snížení potenciálu iritace u spotřebitele.

Výhody a omezení zkoušky cytotoxicity 3T3 NRU jakožto screeningové biologické metody první linie ve strategii zkoušení a hodnocení dermatotropních materiálů byly diskutovány již v předcházejících publikacích (Jírová et al., 2003). Tato práce byla zaměřena na přínos výsledků zkoušek na trojrozměrných modelech lidské kůže a jejich schopnost predikovat účinky látek na lidské kůži in vivo. Dobrá shoda mezi výsledky získanými na trojrozměrném modelu kůže a ve studii na lidských dobrovolnících potvrzuje vhodnost využití kožních modelů pro relevantní predikci reakcí kůže u lidí. Vhodně vybrané metody in vitro jsou nedílnou součástí zkoušení bezpečnosti a účinnosti kosmetických prostředků (SCCP, 2006) jako předstupeň konfirmačních testů ve skupině dobrovolníků.

7. ZÁVĚR

V části práce zaměřené na éterické oleje bylo prokázáno, že přítomnost fotoaktivních složek v esenciálních olejích není jediným předpokladem pro vznik fototoxické / fotoalergické reakce po jejich topické aplikaci na kůži. Esenciální oleje klasifikované jako fototoxické ve zkoušce 3T3 NRU PT nemusí být fototoxické při aplikaci na kůži, zejména v nízkých koncentracích. Pro rozvoj fototoxické / fotoalergické reakce je nezbytná biologická dostupnost látky související s její schopností penetrovat do kůže. Rekonstruované trojrozměrné modely lidské kůže obsahují rohovou vrstvu a jsou používány jako doplňková metoda pro potvrzení pozitivních, případně nejednoznačných výsledků získaných zkouškou 3T3 NRU PT. Výsledky zkoušky fototoxicity vybraných bergamotových, citrusových olejů a oleje z Litsey Cubeby získané zkouškou 3T3 NRU PT a zkouškou na rekonstruovaných trojrozměrných modelech lidské kůže byly ověřeny klinickou studií. Ve zkoušce fototoxicity in vivo ve skupině dobrovolníků byly aplikovány nejvyšší necytotoxické / nefototoxické koncentrace éterických olejů získané zkouškou na rekonstruovaných trojrozměrných modelech lidské kůže. Citrusové oleje se zaznamenanými fototoxickými reakcemi byly aplikovány v další studii s využitím bezpečnostního faktoru 10, byly tedy aplikovány v koncentracích 10 krát nižších. Při zařazení bezpečnostního faktoru 10 nebyly zaznamenány žádné reakce. Zkouška penetrace / absorpce byla provedena pro bergamotový olej, u kterého byl jako fotoaktivní složka detekován bergapten a pro citral. Po 1 hodinové aplikaci byla zjištěna přítomnost bergaptenu i v dermis, čímž je splněn předpoklad biologické dostupnosti fotoaktivní látky nezbytné pro rozvoj fototoxické / fotoalergické reakce. Citral při 1 hodinové aplikaci penetruje pouze do úrovně stripů 1-2 ze stratum corneum a jeho biologická dostupnost pro rozvoj fototoxické / fotoalergické reakce není dostatečná.

Další část práce byla zaměřená na penetraci nově vyvinutého UV filtru Cosolu E a stanovení SPF u fotoprotektivních emulzí se zapracovaným Cosolem E. Zkouška penetrace / absorpce byla provedena pro UV filtr Cosol E s průměrnou velikostí částic 80 a 200 nm a pro fotoprotektivní emulzi se zapracovaným filtrem s průměrnou velikostí částic 200 nm. Bylo prokázáno, že Cosol E s průměrnou velikostí částic 80 nm zůstává na povrchu kůže. Do úrovně stripů 1-2 ze stratum corneum penetrují pouze stopová množství. Cosol E s průměrnou velikostí částic 200 nm penetruje do úrovně stripů 3-4 ze stratum corneum a po zapracování do

fotoprotektivní emulze penetruje až do hlubších vrstev epidermis. Jako vhodnější z hlediska penetrace / absorpce se jeví pro další použití Cosol E, s průměrnou velikostí částic 80 nm. Stanovení ochranného faktoru proti slunečnímu záření u fotoprotektivních emulzí prokázalo vysokou účinnost ochrany proti slunečnímu záření ve všech recepturách s různou výškou ochranného faktoru a s různým obsahem Cosolu E.

V rámci této části práce byly hodnoceny hydratační účinky aktivní ingredience na bázi aloe vera, a to jak ve formě prášku z gelu obsaženém v listech aloe vera, tak ve formě přírodní šťávy. V případě zpracování prášku z gelu nebylo prokázáno statisticky významné zvýšení hydratace po jednorázové ani po opakované aplikaci výrobku se zpracovanou ingrediencí v množství 0,5% prášku. Po zpracování přírodní šťávy získané z listů aloe vera v koncentraci 11% nebylo prokázáno statisticky významné zvýšení hydratace po jednorázové aplikaci, ale až po několikanásobné aplikaci výrobku s obsahem 11% aloe vera juice. Koncentrace 23% aloe juice v receptuře výrobku je hraniční, neboť výrobek s koncentrací aloe juice 23% statisticky významně zvyšuje hydrataci kůže pouze v některých intervalech měření, a to jak po jednorázové, tak po opakované aplikaci. Statisticky významné zvýšení hydratace bylo prokázáno ve všech intervalech měření jako po jednorázové, tak po opakované aplikaci výrobku s obsahem 36% aloe juice. Při vytváření receptury kosmetického prostředku, u kterého je deklarováno významné zvýšení hydratace kůže, je nezbytné použít vhodnou ingredienci s prokázanými hydratačními účinky. Rovněž u finální receptury je, před uvedením výrobku do oběhu, nezbytné potvrdit deklarovaný hydratační účinek.

Další část práce byla zaměřena na průkaz ochranných účinků rostlinných ingrediencí v tenzidových výrobcích. Potvrzení ochranných účinků aktivních složek bylo prokázáno zkouškou cytotoxicity 3T3 NRU u všech rostlinných extraktů alespoň u jedné z použitých koncentrací SLD a tento výsledek byl potvrzen i v testu kožní iritace na modelu rekonstruované lidské kůže. Epikutánní testy ve skupině dobrovolníků potvrdily statisticky významné snížení kožní iritace navozeného modelovým iritantem, a to 2% a 5% SLS, pro extrakty Green Tea 6%, Chamomile 5% a Pronalen Sensitive Skin 5% ve všech intervalech hodnocení. Přidávání ochranných rostlinných přísad do tenzidových kosmetických prostředků může významně přispět ke snížení potenciálu iritace u spotřebitele.

8. SOUHRN

Kosmetické prostředky uváděné na trh Evropského společenství musí mít zhodnocení bezpečnosti výrobku pro zdraví člověka. Součástí vyhodnocení bezpečnosti ingrediencí je posouzení toxikologických údajů včetně penetrace látek. U finálního výrobku je rovněž nezbytné posoudit deklarovaný účinek na základě provedených klinických testů.

U dvou bergamotových olejů byl prokázán potenciál fototoxicity zkouškami in vitro a potvrzen testem ve skupině dobrovolníků. Při zkoušce penetrace byl bergapten, jako fotoaktivní složka, detekován i v dermis již po 1 hodinové aplikaci, čímž je splněn předpoklad biologické dostupnosti fotoaktivní látky pro rozvoj fototoxické/fotoalergické reakce. U citrusových éterických olejů byl prokázán potenciál fototoxicity in vivo pro nejvyšší necytotoxické/nefototoxické koncentrace zjištěné metodami in vitro. Při použití bezpečnostního faktoru 10 nebyly zaznamenány žádné reakce. Zkouška penetrace byla provedena pro citral, který byl detekován na úrovni stripů 1-2 ze stratum corneum a jeho biologická dostupnost pro rozvoj fototoxické reakce je minimální.

Zkouška penetrace/absorpce byla provedena pro UV filtr Cosol E s průměrnou velikostí částic 80 nm, 200 nm a pro fotoprotektivní emulzi Cosolem E 200 nm. Cosol E 200 nm penetruje do úrovně stripů 3-4, fotoprotektivní emulze do epidermis a Cosol E 80 nm zůstává na povrchu kůže. Stanovení SPF in vivo prokázalo dobrou účinnost UV filtru proti UVB složce slunečního záření.

Hydratační účinky aloe vera závisí na formě ingredience a zpracované koncentraci do receptury kosmetického prostředku. V případě použití čerstvé šťávy z listů bylo prokázáno statisticky významné zvýšení hydratace pro výrobek s obsahem 36% šťávy z aloe, a to jak po jednorázové, tak po opakované aplikaci.

Ochranné účinky rostlinných ingrediencí proti rozvoji erytému při podráždění kůže SLS byly hodnoceny metodami in vitro a potvrzeny zkouškou ve skupině dobrovolníků. Extrakty Green Tea 6%, Chamomile 5 % a Pronalen Sensitive Skin 5% prokázaly statisticky významné snížení kožní iritace ve všech intervalech hodnocení.

Klíčová slova: fototoxicita, penetrace, SPF, hydratace, rostlinné extrakty

SUMMARY

Cosmetic products introduced to the market of the European Community have to be evaluated regarding their safety for human health. Safety assessment of ingredients comprises of evaluation of all toxicological data including skin penetration. The claimed effects of the final product have to be confirmed by clinical studies.

Phototoxic potential of two bergamot oils was determined by methods *in vitro* and confirmed *in vivo* in a group of human volunteers. In a penetration study, bergapten was detected in dermis following 1 h application, confirming the bioavailability of this photoactive component responsible for phototoxic/photoallergic reactions. Citrus essential oils were found to be phototoxic *in vivo* when the first non-phototoxic concentrations obtained by methods *in vitro* were used. No adverse skin reactions were recorded if safety factor of 10 was applied. The skin penetration study on citral revealed its limited presence in stratum corneum (strips 1-2) and its bioavailability for phototoxic potential was negligible.

Another skin penetration/absorption study involved UV filter Cosol E (particle size 80 nm and 200 nm) and photoprotective emulsion containing Cosol E (200 nm). Cosol E 200 nm penetrates to the level of strips 3-4, photoprotective emulsion penetrates into epidermis and Cosol E 80 nm remains on the skin surface. The determination of SPF *in vivo* demonstrated high efficacy of this UV filter in protection against UVB.

The hydration effect of aloe vera depends on the ingredient form and concentration used in the cosmetic formulation. In case of fresh aloe leaf juice, a significant increase in hydration after single and repeated application was confirmed for a product containing 36% of aloe juice.

Protective effects of herbal extracts against skin irritation induced by SLS were evaluated by methods *in vitro* and confirmed in a clinical study. Extracts Green Tea 6%, Chamomile 5% and Pronalen Sensitive Skin 5% significantly decreased development of skin irritation in all intervals of skin erythema scoring.

Keywords: phototoxicity, penetration, SPF, hydration, herbal extracts

9. Seznam literatury

Aburjai, T., Natsheh, F.M., (2003). Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research*, 17, 987-1000.

Adams, R.,P., (1995). *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Allured Publishing Corp., Carol Stream, USA.

Akrmann, J., Kubáč, L., Bendová, H., Jírová, D., Kejlová, K., (2008). Quartz plates for determining sun protection in vitro and testing photostability of commercial sunscreens. *Intranational Journal of Cosmetic Science*, 12, 1-11.

Arenberger, P., Obstová, I., (2001). *Obecná dermatologie*. Czechopress Agency, Praha.

Averbeck, D., Averbeck, S., Dubertret, L., Young, A.R., Morlière, P., (1990). Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Photochem Photobiol B*. 7(2-4), 209-29.

Babich, H., Borenfreund, E., (1990). Applications of the Neutral Red Cytotoxicity Assay to in vitro toxicology. *ATLA* 18, 129-144.

Barnes, J., P., (2006). Lipid Composition of Wheat Germ Oil. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, Vol. 84, Issue 7, 256-269.

Basketter, D., A., Chamberlain, M., Griffiths, H., A., Rowson, M., Whittle, E., York, M., (1997). The Classification of Skin Irritants by Human Patch Test. *Food and Chemical Toxicology* 35, 845-852.

Basketter, D.,A., York, M., McFadden, J.,P., Robinson, M.,K., (2004). Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1-4.

Batt, M., Fairhurst, E., (1986). Hydration of the stratum corneum. *International Journal of Cosmetic Science*, Vol 8, Issue 6, 253-264.

Benassi, L., Bertazzoni, G. Seidenari, S., (1999). In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human volunteers. *Contact Dermatitis* 40, 38-40.

Bendová, H., Akrman, J., Krejčí, A., Kubáč, L., Jírová, D., Kejlová, K., Kolářová, H., Brabec, M., Malý, M., (2007). In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor. *Toxicology in Vitro* 21/7, 1268-1275.

Bonoli, M., Marconi, E., Caboni, M., F., (2004). Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours. Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electronic chromatography and spectrophotometry. *Journal of Chromatography A*, 1057, 1-12.

Brod, J., (1991). Characterization and physiological role of epidermal lipids. *International Journal of Dermatology*. Vol. 30, Issue 2, 84-90.

Brůčková, L., Bílková, Z., (2008). Rozdíly v mechanismu kožní senzibilizace dráždivosti. *Alergie* 4. http://www.tigis.cz/alergie/documents/05_Bruckova.pdf.

CEN, (2002). Biological evaluation of medical devices - Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity (ISO 10993-10:2002), Bruxelles.

CIOMS, (2002). International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects. Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS), Geneva.

COLIPA, (1997). Cosmetic Product Test Guidelines for Assessment of Human Skin Compatibility, (Colipa = The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association), Bruxelles.

COLIPA, (2006). International Sun Protection Factor (SPF) Test Method (COLIPA - The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association; CTFA-SA - Cosmetic, Toiletry & Fragrance Association of South Africa; JCIA - Japan Cosmetic Industry Association).

COLIPA, (2007). Method for the in vitro determination of UVA protection provided by sunscreen products. (COLIPA - The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association).

COLIPA, (2008). Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products, Colipa, (COLIPA = The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association), Bruxelles.

De Polo, K. F., (1998). A Short Textbook of Cosmetology. Verlag für chemische Industrie, H.Ziolkowsky GmbH, Germany.

Diffey, B., L., Robson, J., (1989). A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. Journal of the Society of Cosmetic Chemists. 40, 127-133.

Ditrichová, D., (2008). Fotosenzitivní potenciál léčiv pro zevní i celkové použití. Med.Pro Praxi; 5(10): 385-387. Online: www.medicinapropraxi.cz

Draelos, Z., D., (1995). Cosmetics in Dermatology. Churchill Livingstone Inc., New York, USA, 233-244.

Dubakiene, R., Kupriene, M., (2006). Scientific problems of photosensitivity. MEDICINA, 42, 619-624.

Dunitz, M., (1992). The Environmental Threat to the Skin. Martin Dunitz Ltd., The Livery House, 7-9 Pratt Street, London NW1 0AE, ISBN I-85317-057-7, pp.211-214.

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 Communities*, L66, 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), *Official Journal of the European Communities*, L396, Volume 49, 1-849.

EK, (2006). Doporučení Komise 2006/647/ES o účinnosti prostředků na ochranu proti slunečnímu záření a o uváděných tvrzeních, která s nimi souvisí. Úřední věstník Evropské unie.

ES, (2008). Nařízení Komise (ES) č.440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Metoda B.41. Zkouška fototoxicity 3T3 NRU in vitro). Úřední věstník Evropské unie L 142, 31.5.2008, 400-413.

ES, (2008a) Nařízení Komise (ES) č.440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Metoda B.4 Akutní toxicita: dráždivé a leptavé účinky na kůži). Úřední věstník Evropské unie L 142, 31.5.2008, s.182-191.

ES, (2008b). Nařízení Komise (ES) č.440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Metoda B.40a. Leptavé účinky na kůži in vitro: zkouška pomocí modelu lidské kůže). Úřední věstník Evropské unie L 142, 31.5.2008, 394-399.

ES, (2009). Nařízení Komise (ES) č.761/2009, kterým se přizpůsobuje technickému pokroku nařízení (ES) č.440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Metoda B.46. Dráždění kůže in vitro:zkouška pomocí modelu rekonstruované lidské epidermis). Úřední věstník Evropské unie L 220, 27.8.2009, 24-35.

Ettler, K., (2007). Účinky UV záření na kůži a fotoprotekce. Med.Pro Praxi; 6: 273-275.

Fentem, J.,H., Archer, G.,E.,B., Balls, M., Botham, P.,A., Curren, R.,D., Earl, L.,K., Esdaile, D.,J., Holzhütter, H.,G., Liebsch, M., (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, 483–524.

Ferrara, L., Montesano, D., Senatore, A., (2001). The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). Farmaco 56, 397-401. www.elsevier.nl/locate/farmac

Fitzpatrick, T., B., (1988). The validity and practicability of sun-reactive skin types I through VI. Archives Dermatol. 120, 869-871.

Giacomoni, P., U., (2007). Biophysical and Physiological Effects of Solar Radiation on Human Skin. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, M., J., (1999). Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum volgare*) and malt extract and of isolated phenolic compounds. *J Sci Food Agric* 79: 1625-1634.

Haywood, R., Wardman, P., Sanders, R., Ligne, C., (2003). Sunscreens Inadequately Protect Against Ultraviolet-A-Induced Free Radicals in Skin: Implication for Skin Aging and Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 121, 862-868.

Heinrich, U., Tronnier, H., Kockott, D., Kuckuk, R., Heise, H., M., (2004). Comparison of sun protection factors determined by an in vivo and different in vitro methodologies: a study with 58 different commercially available sunscreen products. *International Journal of Cosmetic Science*, 26, 79-89.

Heylings, J., R., Diot, S., Esdaile, D., J., Fasano, W., J., Manning, L., A., Owen, H., M., (2003). A prevalidation study on the in vitro skin irritation function test (SIFT) for prediction of acute skin irritation in vivo: results and evaluation of ECVAM Phase III. *Toxicology in Vitro* 17, 123-138.

Hrabálek, A., Vávrová, K., (2005). Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékařství*, 8-11.

Hsu, J.C., (1996). *Multiple Comparisons. Theory and Methods*. Chapman&Hall/CRC, Boca Raton.

[http:// utb.cepac.cz/](http://utb.cepac.cz/); *Chemie a technologie tuků a detergentů (e-learningová skripta)*

Charbonnier, V., Morrison, B., M., Paye, M., Maibach, H.I., (1998). Open application assay in investigation of subclinical irritant dermatitis induced by sodium lauryl sulfate (SLS) in man: advantage of squamometry, *Skin Research and technology*, 4, 244-250.

Jírová, D., Kejlová, K., Brabec, M., Bendová, H., Kolářová, H., (2003). The benefits of the 3T3 NRU test in the safety assessment of cosmetics: long-term experience from pre-marketing testing in the Czech Republic. *Toxicology in vitro* 17, 2003, 791-796.

Jones, P.A., King, A.V., Earl, L.K., Lawrence, R.S., (2003). An assessment of the phototoxic hazard of a personal product ingredient using in vitro assays. *Toxicology in Vitro* 17, 471-480.

Joshi, P.C., Pathak, M.A., (1983). Production of singlet oxygen and superoxide radicals by psoralens and their biological significance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 112, 638-646.

Juneby, H., B., (2009). *Aloe barbadensis* - a legendary medicinal plant. http://www.fkog.uu.se/course/essays/aloe_barbadensis.pdf

Kandárová, H., (2006). Evaluation and Validation of Reconstructed Human Skin Models as Alternatives to Animal Tests in Regulatory Toxicology. Dissertation - Freie Universität Berlin. Open Access Document, published online on 26.07.2006 at <http://www.diss.fu-berlin.de/2006/381/indexe.html>

Katiyar, S., Elmets, C., A., Katiyar, S., K., (2007). Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA reappear. *J Ntr Biochem.* 18(5), 287-296.

Katiyar, S.K., Afaq, F., Perez, A., Mukhtar, H., (2001). Green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis*, vol.22, no.2, pp. 287-294.

Kejlová, K., Jírová, D., Bendová, H., Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Kolářová, H., Liebsch, M., (2007). Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Toxicology in Vitro* 21, 1299-1303.

Kligman, A.M., Breit, R., (1968). The identification of phototoxic drugs by human assay. *Journal of Investigative Dermatology* 51, 90-99.

Křen, V., Walterová, D., (2005). Silybin a silymarin - New effects and applications. *Biomed.Papers* 149 (1), 29 - 41.

Leung, A.Y., Foster, S., (2003). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Liangli, Y., (2008). *Wheat Antioxidants.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 1-51.

Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Gerberick, G. F., Cruse, L., Diembeck, W., Pfannenbecker, U., Spieker, J., Holzhütter, H.-G., Brantom, P., Aspin, P.,

Southee, J., (1999). Prevalidation of the EpiDerm™ Phototoxicity Test. In: Alternatives to Animal Testing II. Edited by D. G. Clark, S. G. Lisansky and R. Macmillan. COLIPA, Brussels, 160-167.

Liebsch, M., Spielmann, H., Pape, W., Krul, C., Deguercy, A., Eskes, Ch., (2005). UV-Induced Effects. ATLA 33, Suppl. 1, 131–146.

Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, Ch., Spielmann, H., Upholl, P., Wilkins, S., McPherson, J.,P., Wiemann, Ch., Kaufmann, T., Remmele, M., Holzhütter, H.,G., (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing. ATLA 28, 371–401.

Litvik, R.(2008). Úloha kožní bariéry u atopické dermatitidy.
www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/1032.

Loveday, K.S. (1996). Interrelationship of photocarcinogenicity, photomutagenicity and phototoxicity. Photochem. Photobiol. 63, 369–372.

Lovell, W.W., Sanders, D.J., (1992). [Phototoxicity testing in guinea-pigs](#). Food and Chemical Toxicology, Volume 30, Issue 2, 155-160.

Machovcová, A., (2006). Kontaktní dermatitidy. Paedr.prax, 63-67.

Machovcová, A., (2008). Kontaktní dermatitidy: Med.Pro praxi; 5(9): 325-328.

Maillard, M, N., Soum, M., H., Boivin, P., Berset, C. (1996). Antioxidant Activity of barley nad Malt: Relationship with Phenolic Content. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, Volume 29, Issue 3, 238-244.

Malina, L., (1999). Fotodermatózy. Maxdorf s.r.o. Praha.

Marzulli, F.N., Maibach, H.I., (1987). Phototoxicity (photoirritation) of topical and systemic agents. In: Dermatotoxicology. Ed. Marzulli, F.N., Maibach, H.I., Hemisphere, Washington, DC. 431- 440.

Marzulli, F.N., Maibach H.I., (2004). Photoirritation (Phototoxicity, Phototoxic Dermatitis). In: Dermatotoxicology 6th Edition. Ed. Zhai, H., Maibach H.I., CRC Press, Boca Raton. 341-353.

Morlière, P., Hüppe, G., Averbeck, D., Young, A.R., Santus, R., Dubertret, L., (1990) In vitro photostability and photosensitizing properties of bergamot oil. Effects of a cinnamate sunscreen. *J Photochem Photobiol B.* 7(2-4), 199-208.

Neumann, N.,J., Hölzle, E., Plewig, G., Schwarz, T., Panizzon, R.,G., Breit, R., Ruzicka, T., (2000). Photopatch testing: The 12-year experience of the German, Austrian, and Swiss Photopatch Test Group. *Journal of American Academy of Dermatology*, 183-192.

Nicholson, M., Willis, C.,M., (1999). The influence of patch test size and design on the distribution of erythema induced by sodium lauryl sulfate. *Contact Dermatitis* 41, 264-267.

Nilsson, R., Maurer, T., Redmond, N., (1993). A standard protocol for phototoxicity testing. Results from an interlaboratory study, [Contact Dermatitis Volume 28, Issue 5](#), 285 - 290.

Nixon, G.,A., Tyson, C.,A., Wertz, W.,C., (1975). Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicology and Applied Pharmacology*31, 481-490.

Nohynek, G.,J., Schaefer, H., (2001). Benefit and Risk of Organic Ultraviolet Filters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 33, 28-299.

Novotný, F. et al., (1989). *Obečná dermatologie*. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha.

OECD, (1981). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 101: UV-VIS Absorption Spectra (Original Guideline, adopted 12th May 1981). Online <http://www.oecd.org/>.

OECD, (2004). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (Original Guideline, adopted 13th April 2004). Online: <http://www.oecd.org/>

OECD, (2004a). Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test. OECD, Paris, France, 1-8. Online: <http://www.oecd.org/>

OECD, (2004b). Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 428 Skin Absorption: in vitro Method. OECD (Original Guideline, adopted 13th April 2004)

Online: <http://www.oecd.org/>.

Phillips, L., Steinberg, M., Maibach, H.I., Akers, W., (1972). A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 21(3), 369-382.

Pissavini, M., Ferrero, L., Alard, V., Heinrich, U., Tronnier, H., Kockott, D., Lutz, D., Tournier, V., Zambonin, M., Meloni, M., (2003). Determination of the In Vitro SPF. *Cosmetics & Toiletries Magazine*, vol. 18, No.10, 63-72.

Porter, M., R., (1994). *Handbook of surfactants*. Blackie Academic and Professional. Chapman & Hall, Wester Cleddens Road, Bishopbriggs, Glasgow G64 2NZ, ISBN 0751401706.

Prakash, P., Gupta, N., (2005). Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. *Indian J Physiol Pharmacol*, 49 (2), 125-131.

Presibella, M., M., De Biaggi, L., De Biaggi Villas-Bôas, L., da Silva Belleti, K., M., de Moraes Santos, C., A., Weffort-Santos, A., M., (2006). Comparison of Chemical Constituent of *Chamomilla recutita* (L.) Rauscher Essential oil and its Anti-Chemotactic Activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 49, n.5, pp 717-724.

Prokeš, J., (2006). *Výroba sladu.*, <http://www.pivovarska-skola.cz/slad.htm>

Ramachandra, C.T., Srinivasa Rao, P., (2008). Processing of Aloe Vera Leaf Gel: A Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3 (2), 502-521.

Rogiers, V., Pauwels, M., (2008). Safety assessment of cosmetics in Europe. *Current Problems in Dermatology*, Vol. 36., S.Karger AG, Basel.

Sayre, R., M., (1993). Correlation of in-vivo, in-vitro SPF predictions. *Cosmetics and Toiletries*, (108), 111-114.

SCCNFP/0690/03 Final (2003). The SCCNFP'S Notes of Guidance for Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation.

SCCP, (2006). The SCCP's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 6th revision.

Schlienamm, S., Elsner, P., (2007). Skin Protection. Curr Probl Dermatol. Basel, Karger, vol 34, pp 98-110.

Simon, J., E., (1998). Basil.

<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/CropFactSheets/basil.html>

Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., Brantom, P., (1998). The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology in Vitro 12, 305–327.

Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I., Zuang, V., (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559–601.

Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., Sladowski, D., (1994). In vitro phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA 22, 314-348.

Spielmann, H., Müller, L., Averbeck, D., Balls, M., Brendler-Schwaab, S., Castell, J.V., Curren, R., de Silva, O., Gibbs, N.K., Liebsch, M., Lovell, W.W., Merk, H.F., Nash, J.F., Neumann, N.J., Pape, W.J.W., Ulrich, P., Vohr, H.W., (2000). The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 42. ATLA 28, 777-815.

Stern, R.S., (1998). Photocarcinogenicity of drugs . [Toxicology Letters](#) 102/103, 389-392.

Suanarunsawat, T., Na Ayutthaya, W., D., Songsak, T., (2009). Anti-lipidemic action of essential oil extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with high cholesterol diet. J Appl Bimed 7, 45-53.

Šmidrkal, J., (1999). Tenzidy a detergenty dnes. Chem.Listy 93, 421-427.

Tisserad, R., Balacs, T., (1995). Essential oil safety a guide for health care professionals. Churchill Livingstone, Elsevier Limited.

Treffel, P., Gabard, B., (1996). Measurement of Sodium Lauryl Sulfate - induced Skin Irritation. Acta Derm Venerol (Stockh), 76, 341-343.

Vyhláška MZ ČR č. 448/2009 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, ve znění pozdějších předpisů.

Weltfriend, S., Ramon, M., Maibach, H.I., (2004). Irritant dermatitis (Irradiation). In: Zhai, H., Maibach, H.I. (Eds.), Dermatotoxicology (6th Edition), Boca Raton, CRC Press LLC.

Wilson, R., (1995). A Complete Guide to Understanding and Using Aromatherapy for Vibrant Health & Beauty, ISBN 0-89529-627-6.

Young, A.R., Walker, S.L., Kinley, J.S., Plastow, S.R., Averbek, D., Morlière, P., Dubertret, L., (1990). Phototumorigenesis studies of 5-methoxypsoralen in bergamot oil: evaluation and modification of risk of human use in an albino mouse skin model. J Photochem Photobiol B. 7(2-4), 231-50.

Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví, ve znění pozdějších předpisů.

Zhai, H., Brachman, F., Pelosi, A., Anibogu, A., Ramos, M.B., Torralba, M.C., Maibach, H.I., (2000). A bioengineering study on the efficacy of a skin protectant lotion in preventing SLS-induced dermatitis. Skin Research and Technology, vol. 6, 77-80.

Zhai, H., Maibach, H.I., (2004). Dermatotoxicology, 6th edition. CRC Press LLC, Boca Raton, USA.

Zhai, H., Maibach, H.I., (1998). Moisturizers in preventing irritant contact dermatitis: an overview. Contact Dermatitis 38, 1998, 241-244.

10. Publikační činnost autora

Publikace článků v odborných časopisech a sbornících s IF

1. Kejlová, K., Jírová, D., **Bendová, H.**, Gajdoš, P., Kolářová H. Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. *Toxicology in Vitro*. V tisku.
2. Kejlová, K., Jírová, D., **Bendová, H.**, Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Kolářová, H., Liebsch, M. (2007) Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Toxicology in Vitro* 21/7, 1298-1303. **IF 2,473**
3. **Bendová, H.**, Akrman, J., Krejčí, A., Kubáč, L., Jírová, D., Kejlová, K., Kolářová, H., Brabec, M., Malý, M. (2007) In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor. *Toxicology in Vitro* 21/7, 1268-1275. **IF 2,473**
4. Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., **Bendová, H.**, Kejlová, K., Marriott, M., Kandarova, H. (2010) Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data. *Contact Dermatitis* 62, 109–116. **IF 3,47**

Publikace článků v odborných časopisech a sbornících bez IF

1. Jírová, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlová, K., **Bendová, H.**, Marriott, M., Kandarova, H. (2008) Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation (AATEX)*14, Special Issue March 31, 2008, 359-365.
2. Akrman, J., Kubáč, L., **Bendová, H.**, Jírová, D., Kejlová, K. (2009) Quartz plates for determining sun protection in vitro and testing photostability of commercial sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science* 31/ 2, 119-129.
3. **Bendová, H.**, Kejlová, K., Jírová, D., Kolářová, H., Malý, M.. Rostlinné kosmetické ingredience - ochranné účinky hodnocené metodami in vitro a potvrzené studií ve skupině dobrovolníků in vivo. *Derma*. V tisku

Publikace abstrakt ze zahraničních konferencí v časopisech s IF

1. **Bendová, H.**, Basketter, D., Kandárová, H., Marriott, M., Kejlová, K., Jírová, D., Spiller, E., Malý, M., Liebsch, M. (2007) Comparison of human patch test and 3D human skin model results with classification of chemicals based on rabbit Draize test. 14th Congress on Alternatives to Animal Testing, September 28-30, 2007, University of Linz, Austria. *ALTEX* 4/2007, p.349. **IF 1,309**
2. Liebsch, M., Jírová, D., Kejlová, K., **Bendová, H.**, Kandarova, H., Tharmann, J., Traue, D., Spielmann, H. (2007) ECVAM Photopotency Feasibility Study: In Vitro Skin Model Phototoxicity Test for Determination Phototoxic Potency of Topical Phototoxins. 14th Congress on Alternatives to Animal Testing, September 28-30, 2007, University of Linz, Austria. *ALTEX* 4/2007, p.351. **IF 1,309**
3. Kandárová, H., Kejlová, K., Jírová, D., **Bendová, H.**, Tharmann, J., Traue, D., Spielmann, H., Liebsch, M. (2007) ECVAM Feasibility Study: Can the prevalidated in vitro Skin Model Phototoxicity Assay be upgraded to quantify phototoxic potency of topical phototoxins? Eurotox 2007, The 44th Congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam, 7-10 October, 2007. *Toxicology Letters* 172, Suppl. 1, 81-82. **IF 3,249**
4. **Bendová, H.**, Basketter, D., Kandarova, H., Jírová, D., Marriott, M., Kejlová, K., Spiller, E., Liebsch, M. (2008) Predicting skin irritation: in vivo rabbit test vs. 4h human patch test and in vitro human skin model test. Society of Toxicology 47th Annual Meeting and ToxExpo, March 16-20, 2008, Seattle, Washington, USA. *The Toxicologist CD – An official Journal of the Society of Toxicology*, Volume 102, Number S-1, Abstract 333, p.68. **IF 3,814**
5. **Bendová, H.**, Kejlová, K., Jírová, D., Malý, M., Kolářová, H. (2008) Protective effects of herbal cosmetic ingredients assessed in cell and tissue cultures and in human studies. 15th Congress on Alternatives to Animal Testing, September 19-21, 2008, Linz, Austria. *ALTEX* 25, Suppl. 1, 8-9. **IF 1,309**
6. Kejlová, K., Jírová, D., **Bendová, H.**, Petrů, M., Kolářová, H. (2008) Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. 15th Congress on Alternatives to Animal Testing, September 19-21, 2008, Linz, Austria. *ALTEX* 25, Suppl. 1, p.35. **IF 1,309**

7. Jírová, D., Basketter, D., **Bendová, H.**, Marriott. M., Kejlová, K., Kandarova, H., Liebsch, M. (2008) Comparison of results of the 4 h human skin irritation patch test and in vitro human skin irritation test (EpiDerm SIT) with existing classification of chemicals. 45. Congress of the European Societies of Toxicology, October 5-8, 2008, Rhodes, Greece. *Toxicology Letters* 180, Suppl. 1, p.108. **IF 3,249**
8. Jírová, D., Janoušek, S., Kejlová, K., **Bendová, H.**, Kolářová, H., Malý, M. (2009) Skin and eye hazard tested in vitro in a group of chemicals with reference human skin irritation data. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 30-September 3, 2009, Rome, Italy. *ALTEX* 26, Spec. Issue, p.286. **IF 1,309**

Publikace abstrakt ze zahraničních konferencí v časopisech a sbornících

1. Jírová, D., Kejlová, K., **Bendová, H.**, Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Liebsch, M. (2006) Phototoxicity of bergamot oils assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Abstracts: 14th International Workshop on In Vitro Toxicology*, 2. – 5.10. 2006, Ostend, Belgium, P 4.7.
2. **Bendová, H.**, Krejčí, A., Akrman, J., Kubáč, L., Jírová, D., Kejlová, K. (2006) A novel in vitro approach to evaluation of UVA and UVB protection of sunscreen products. *Abstracts: 14th International Workshop on In Vitro Toxicology*, 2. – 5.10. 2006, Ostend, Belgium, P 3.9.
3. **Bendová, H.**, Jírová, D., Kejlová, K. (2006) Metody průkazu funkce u kosmetických prostředků (Cosmetic products – evaluation of efficacy). *Proceedings of International Conference of Cosmetology* (Eds. J. Hojerová, M. Staroň), October 4 – 6, 2006, Bratislava, Slovakia, p.87.
4. Jírová, D., Kejlová, K., **Bendová, H.**, Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Liebsch, M. (2006) Phototoxicity of bergamot oils assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Proceedings of International Conference of Cosmetology* (Eds. J. Hojerová, M. Staroň), October 4 – 6, 2006, Bratislava, Slovakia, p.121.
5. **Bendová, H.**, Krejčí, A., Akrman, J., Kubáč, L., Jírová, D., Kejlová, K. (2006) A novel in vitro approach to evaluation of UVA and UVB protection of sunscreen products.

- Proceedings of International Conference of Cosmetology* (Eds. J. Hojerová, M. Staroň), October 4 – 6, Bratislava, Slovakia, p.123.
6. Jírová, D., **Bendová, H.**, Kejlová, K. (2006) Stanovení SPF u prostředků ke slunění pomocí metod in vivo a in vitro (SPF of sunscreen products evaluated by methods in vivo and in vitro). *Proceedings of International Conference of Cosmetology* (Eds. J. Hojerová, M. Staroň), October 4 – 6, 2006, Bratislava, Slovakia, p.75.
 7. Jírová, D., Basketter, D., **Bendová, H.**, Marriott, M., Kejlová, K., Kandarova, H., Spiller, E., Liebsch, M. (2007) Human Skin Irritation Study Supports Results of 3D Human Skin Model In Vitro. *Program & Abstracts: Third International Conference Occupational & Environmental Exposures of skin to Chemicals* (Eds. A.K. Bowers, A.L. Bunge), June 17 – 20, 2007, Golden, Colorado, USA, 55-57.
 8. Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Kandarova, H., Kejllova, K., **Bendova, H.**, Marriott, M., Spiller, E. (2007) Comparison of Human Skin Irritation and Photirritation Patch Test Data with Cellular in vitro Assays and Animal in vivo data. *Abstracts: 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences*, August 21-25, 2007, Tokyo, Japan, p.63.
 9. Jírová, D., Štěpánková, E., Kubáč, L., **Bendová, H.**, Horčíková, E., Akrman, J., Kejlová, K., Rádlová, M. (2008) Hodnocení bezpečnosti kosmetických prostředků s využitím alternativních metod. *Proceedings: International Conference of Cosmetology* (Ed. Hojerová, J.), October 1-3, 2008, Bratislava, Slovakia, 53-58.
 10. Kandárová, H., Kejlová, K., Jírová, D., **Bendová, H.**, Tharmann, J., Traue, D., Spielmann, H., Liebsch, M. (2009) ECVAM Feasibility Study: Can the prevalidated in vitro Skin Model Phototoxicity Assay be upgraded to quantify phototoxic potency of topical phototoxins? *Abstracts: Symposium 20th Anniversary of ZEBET at BfR and 50 Years of the 3Rs Principle*, October 26-27, 2009, Berlin, Germany, p.45.
 11. Jírová, D., **Bendová, H.**, Kejlová, K., Basketter, D., Kandárová, H., Marriott, M., Malý, M., Liebsch, M. (2009) Comparison of human patch test and 3D human skin model results with classification of chemicals based on rabbit Draize test. *Abstracts: Symposium 20th Anniversary of ZEBET at BfR and 50 Years of the 3Rs Principle*, October 26-27, 2009, Berlin, Germany, p.44.

12. Kolářová, H., Tománková, K., Kolář, P., Jírová, D., Kejlová, K., **Bendová, H.** (2009) Study of photodynamic effect on MCF7 cell lines by fluorescence methods. *Molecular Biology of the Cell* 20 (suppl.), abstract 786/ B733. The 49. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, December 5-9, 2009, San Diego, USA. Online: www.ascb.org/meetings/abstract.cfm.
13. Tománková, K., Kolářová, H., Kolář, P., Jírová, D., Kejlová, K., **Bendová, H.** (2009) Study of cytotoxic effect of photodynamic active drugs on NIH3T3 cell line morphology. *Molecular Biology of the Cell* 20 (suppl.), abstract 784/B731. The 49. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, December 5-9, 2009, San Diego, USA. Online: www.ascb.org/meetings/abstract.cfm.

Publikace abstrakt ve sbornících z tuzemských konferencí s mezinárodní účastí

1. Jírová, D., Kejlová, K., **Bendová, H.** (2006) Metody stanovení dermatotoxicity u kosmetických prostředků a dalších materiálů. XXIII. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XI. kongres českých a slovenských imunologů, 25.- 28. října 2006, Hradec Králové. *Alergie (časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii)*, Ročník 8, Supplementum 2, 2006, s.58. Online: www.tigis.cz/alergie/index.htm.
2. Jírová, D., Janoušek, S., Kejlová, K., **Bendová, H.**, Kolářová, H., Malý, M. (2009) Skin and eye hazard tested in vitro in a group of chemicals with reference human skin irritation data. 27th Annual Workshop of the Scandinavian Society for Cell Toxicology, Lázně Sedmihorky, Czech Republic, September 16-19, 2009. *Programme and Abstracts* (Eds. Miroslav Červinka, Zuzana Červinková), Tribun EU s.r.o., Brno, p.25. ISBN 978-80-7399-818-9.
3. Kejlová, K., Jírová, D., **Bendová, H.**, Petrů, M., Kolářová, H. (2009) Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. 27th Annual Workshop of the Scandinavian Society for Cell Toxicology, Lázně Sedmihorky, Czech Republic, September 16-19, 2009. *Programme and Abstracts* (Eds. Miroslav Červinka, Zuzana Červinková), Tribun EU s.r.o., Brno, p.27. ISBN 978-80-7399-818-9.