

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

**STUDIUM ÚČINKŮ ZÁŘENÍ A CHEMICKÝCH FAKTORŮ
NA BUNĚČNÉ A TKÁŇOVÉ SYSTÉMY**

RNDr. Kristina Kejlová

Školitel: Doc. RNDr. Hana Kolářová, CSc.
Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci pod vedením Doc. RNDr. Hany Kolářové, CSc., vypracovala zcela 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 osobní pomoc během studia.

Dále děkuji MUDr. Dagmar Jírové, CSc., za cenné rady a vytvoření výborných pracovních podmínek. Můj dík patří také kolegům ze Státního zdravotního ústavu: RNDr. Haně Bendové, Ing. Petru Gajdošovi, Ing. Marii Rádlové a paní Daně Šimákové za pomoc při experimentální práci, RNDr. Marku Malému, CSc., za statistické hodnocení dat, a RNDr. Stanislavu Janouškovi za poskytnutí jeho experimentálních výsledků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Dr.rer.nat., Ing. Heleně Kandářové za cenné rady a praktický zácvik při práci s rekonstruovanými modely lidských tkání.

Tato práce byla podporována grantovými projekty IGA MZ ČR č.NS 9648-4/2008 a MPO č.FT-TA3/050.

Obsah

Seznam zkratk	7
1. Úvod	10
1.1. Kožní dráždivost	14
1.1.1. Kůže - struktura a funkce	14
1.1.2. Dráždění kůže	15
1.1.3. Zkoušení kožní dráždivosti	16
1.2. Oční dráždivost	21
1.2.1. Oko - struktura a funkce	21
1.2.2. Dráždění oka	23
1.2.3. Zkoušení oční dráždivosti	24
1.3. Biologické účinky slunečního záření – fototoxicita	27
1.3.1. Účinky slunečního záření na organismus	27
1.3.2. Ochrana kůže před slunečním zářením	28
1.3.3. Fotosensibilizace	30
1.3.4. Fototoxicita éterických olejů	33
1.3.5. Hodnocení fototoxických účinků	36
2. Experimentální část	38
2.1. Cíle práce	38
2.2. Materiál a metodika	39
2.2.1. Buněčné a tkáňové kultury	39
2.2.1.1. Buněčná linie Balb/c 3T3	39
2.2.1.2. EpiDerm TM - rekonstruovaný model lidské epidermis	40
2.2.1.3. EpiOcular TM - rekonstruovaný model lidské rohovky	41
2.2.1.4. Barvení MTT	43
2.2.2. Analytické metody	44
2.2.2.1. Fluorimetrie	44
2.2.2.2. Spektrofotometrie	44
2.2.2.3. Chromatografie	44
2.2.3. Kožní dráždivost	47
2.2.3.1. Chemické látky	47
2.2.3.2. UV filtry	48
2.2.3.3. Zkouška kožní dráždivosti s využitím modelu EpiDerm TM	48

2.2.3.4. Epikutánní test kožní dráždivosti (4h Human Patch Test – 4HPT).....	49
2.2.4. Oční dráždivost	51
2.2.4.1. Oftalmologické přípravky	51
2.2.4.2. Chemické látky	51
2.2.4.3. Kosmetické prostředky	52
2.2.4.4. Zkouška oční dráždivosti NEUTRAL RED RELEASE (NRR)	52
2.2.4.5. Zkouška oční dráždivosti NEUTRAL RED UPTAKE (NRU)	53
2.2.4.6. Zkouška oční dráždivosti s využitím modelu EpiOcular™	55
2.2.4.6.1. Postup zkoušky dle SOP pro chemické látky ("REACH")....	55
2.2.4.6.2. Postup zkoušky dle SOP pro rozpustné materiály ("Dilution Method“)	56
2.2.4.7. Zkouška oční dráždivosti s využitím chorioalantoidní membrány slepičího embrya (HET-CAM)	57
2.2.5. Biologické účinky záření – fototoxicita	58
2.2.5.1. Bergamotové a jiné éterické oleje	58
2.2.5.2. UV filtry	58
2.2.5.3. Světelný zdroj	61
2.2.5.4. Zkouška fototoxicity 3T3 NRU PT	62
2.2.5.5. Zkouška fototoxicity s využitím modelu EpiDerm™	64
2.2.5.6. Epikutánní test fototoxicity (Human photopatch test)	65
2.3. Výsledky a diskuse	67
2.3.1. Kožní dráždivost	67
2.3.1.1. Kožní dráždivost 25 chemických látek	67
2.3.1.1.1. Výsledky	68
2.3.1.1.2. Diskuse	72
2.3.1.2. Kožní dráždivost UV filtrů	74
2.3.1.2.1. Výsledky	74
2.3.1.2.2. Diskuse	75
2.3.2. Oční dráždivost	76
2.3.2.1. Oftalmologické přípravky	76
2.3.2.1.1. Výsledky	76
2.3.2.2. Chemické látky	76
2.3.2.2.1. Výsledky	77
2.3.2.2.2. Statistické zhodnocení	80

2.3.2.3. Kosmetické prostředky	81
2.3.2.3.1. Výsledky	81
2.3.2.3.2. Statistické hodnocení	82
2.3.2.4. Diskuse	83
2.3.3. Biologické účinky záření – fototoxicita	88
2.3.3.1. Fototoxicita bergamotových olejů	88
2.3.3.1.1. Výsledky	88
2.3.3.1.2. Diskuse	95
2.3.3.2. Fototoxicita dalších éterických olejů	97
2.3.3.2.1. Výsledky	97
2.3.3.2.1. Diskuse	105
2.3.3.3. Fototoxicita UV filtrů	108
2.3.3.3.1. Výsledky	108
2.3.3.3.2. Diskuse	110
2.4. Závěr	112
2.5. Souhrn	115
2.6. Summary	116
Seznam použité literatury	117
Publikační činnost autora	127

Seznam zkratk a symbolů

3R	Reduction, Refinement, Replacement
3T3 NRU PT	Zkouška fototoxicity 3T3 NRU
4HPT	4h Human Patch Test
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability Test
BO	bergamotový olej
CAAT	Center for Alternatives to Animal Testing
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Sciences
COLIPA	European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association
DMEM	Dulbeccova modifikace esenciálního media
DMP	3,4-dimethyl-1-H-pyrazol
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DXP	2-isopropyl-2-isobutyl-1,3-dimethoxypropan
EC	European Community
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECETOC	European Centre for the Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ECVAM	European Center for Validation of Alternative Methods
EEC	European Economic Community
EPA	Environmental Protection Agency
ET50	dobu nutná ke snížení životnosti tkání na 50% oproti kontrole po aplikaci cytotoxické látky
FCF	furocoumarin-free
FRAME	Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments
FSU	Fluorescence Standard Unit (fluorescenční jednotky)
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
HET-CAM	Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane
IC ₅₀	koncentrace látky způsobující pokles životnosti buněčné kultury na 50% oproti kontrole

ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICE	Isolated Chicken Eye
IČ	infračervené záření
IF	Impact Factor
IFRA	International Fragrance Association
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
IPP	Směs isomerů: 1-(2-isopropylfenyl)-1-fenylethan, 1-(3-isopropylfenyl)-1-fenylethan, 1-(4-isopropylfenyl)-1-fenylethan
IS	iritační skóre
JRC	Joint Research Centre
IRE	Isolated Rabbit Eye
JSAAE	Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments
MEHZn	bis[(1-methylimidazol)-(2-ethyl-hexanoát)], Zn komplex
MPE	Mean Photo Effect (střední světelný účinek)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2 <i>H</i> -tetrazolium-bromid
NC	neklasifikováno (nedráždí)
NCD	New Chemicals Database
NK	negativní kontrola
NR	Neutral Red (neutrální červeně)
NRC	Národní referenční centrum
NR	Neutral Red Release (uvolnění neutrální červeně)
NR ₅₀	koncentrace testované látky v mg/ml, která způsobila uvolnění 50% NR z buněčné kultury oproti kontrolní kultuře
NRU	Neutral Red Uptake (příjem neutrální červeně)
NRU ₅₀	koncentrace testované látky způsobující pokles životnosti buněčné kultury na 50% oproti kontrolní kultuře
OD	optická denzita
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PBS	fyziologický roztok pufovaný fosfátem
PIF	Photo Irritation Factor (fotoiritační faktor)
PK	pozitivní kontrola
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
R36	dráždí oko

R38	dráždí kůži
R41	leptá oko
ROS	reaktivní formy kyslíku
SLS	laurylsíran sodný
SOP	Standardní operační postup
SPIR	směs isomerů: 1-(spiro[4.5]dec-7-en-7-yl)pent-4-en-1-on, 1-(spiro[4.5]dec-6-en-7-yl)pent-4-en-1-on
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TG	Test Guideline (OECD)
TSCA	Toxic Substance Control Act
UV	ultrafialové záření
vis	viditelné záření
VÚOS	Výzkumný ústav organických syntéz a.s., Rybitví
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

1. Úvod

Lidský organismus je po dobu svého života nepřetržitě vystaven vlivu řady fyzikálních, chemických i biologických faktorů. Zkoumání těchto faktorů je od nepaměti předmětem lidského poznání a je spojeno s použitím zvířat jako experimentálního modelu při vývoji medicíny či vědy. První zmínky o pokusech na zvířatech se objevují již u starověkých Egyptanů, Řeků a Římanů, ale k obrovskému nárůstu počtu zvířat používaných v pokusech došlo až s průmyslovou revolucí a prudkým rozvojem oborů medicíny, farmacie či toxikologie ve 20. století. Především rozvoj chemického průmyslu v 19. století a farmacie ve 20. století vedl k výrobě obrovského množství nových látek s neznámými účinky na lidský organismus, jejichž bezpečnost bylo nutné ověřit před uvolněním na trh. Po celosvětové tragédii způsobené teratogenním přípravkem Thalidomid vzrostl význam i rozsah toxikologie nebývalou měrou a byla přijata řada opatření a zákonů stanovující zásady zkoušení nových látek z hlediska jejich akutní i chronické toxicity, senzibilizace, mutagenity, karcinogenity, teratogenity, reprodukční toxicity apod.

S rozvojem experimentální činnosti na zvířatech je spojena i společenská tendence pokusy z etických důvodů omezit či zcela zakázat. Již v roce 1876 byl ve Velké Británii přijat zákon omezující kruté zacházení se zvířaty ("Cruelty to Animals Act") a v roce 1898 byl v Bristolu založen Britský svaz proti vivisekci (British Union Against Vivisection), který je dodnes významnou nevládní organizací prosazující humánní přístup ke zvířatům a jejich ochranu. V roce 1959 se poprvé objevuje pojem "alternativní metoda k pokusu na zvířeti" a princip 3R v knize britských vědců Russella a Burche "The Principles of Humane Experimental Technique". Alternativní metodou je postup, při němž dochází k redukci počtu zvířat (Reduction), zmírnění utrpení zvířat změnou protokolu (Refinement) či nahrazení zvířat jiným modelem (Replacement). Tato koncepce se stala hnacím motorem vědeckého vývoje ve druhé polovině 20. století a vedla k vytvoření mnoha postupů in vitro (Russell, 1995).

V 60. letech 20. století, zaměřených na lidská práva, začal z etických a společenských důvodů růst silný tlak na omezení pokusů na zvířatech, především v oblasti kosmetických prostředků. Ve Velké Británii v roce 1969 vznikl Fond pro nahrazení zvířat v lékařských experimentech (FRAME), jenž zakotvil princip 3R přímo ve své zakládací listině. Rozsáhlé demonstrace koncem 70. let před centrály firem Revlon a Avon v USA vedly Asociaci výrobců kosmetiky a toaletního zboží (COLIPA) k vyčlenění finančních prostředků a založení Centra pro alternativy k pokusům na zvířatech (Center for Alternatives to Animal Testing, CAAT) při Universitě Johns Hopkinse (Rienzi, 2006).

V následujících letech vznikla celosvětově řada dalších organizací zaměřených na vývoj a implementaci alternativních metod, např. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) v USA, Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) v Německu či Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments (JSAAE) v Japonsku.

V roce 1986 přijala Rada Evropy Směrnici 86/609/EHS zabývající se ochranou zvířat použitých pro experimentální a jiné vědecké účely. Tato směrnice, která je v současné době revidována, má za cíl maximalizovat pohodu (welfare) experimentálních zvířat a snižovat jejich počet při pokusech v oblasti zkoušení léčiv, potravin i chemických látek. V odstavci 7.2 směrnice 86/609/EHS je uvedeno, že: "Pokus [na zvířeti] nesmí být proveden, pokud je dostupná jiná, vědecky platná metoda bez použití zvířete, která může být využita za účelem získání požadovaného výsledku." Odstavec 23.1 také stanovuje, že vlády zemí EU by měly propagovat alternativní metody: "Evropská komise a členské státy by měly podporovat výzkum týkající se vývoje a validace alternativních technik, které dokáží poskytnout informace na stejné úrovni jako testy na zvířatech, přičemž by tyto pokusy měly vyžadovat použití menšího množství zvířat nebo zahrnovat méně bolestivé procedury." (EHS, 1986).

V roce 1991 bylo Evropskou komisí na základě Směrnice 86/609/EHS založeno Evropské centrum pro validaci alternativních metod (The European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), při Společném výzkumném centru Evropské komise (Joint Research Centre, JRC), jehož posláním je vývoj, validace a prosazení vědeckého i legislativního přijetí alternativních metod v Evropském společenství.

Požadavek na nahrazení zkoušek na zvířatech alternativními metodami se objevil také v tzv. 7. dodatku Kosmetické směrnice (Směrnice 2003/15/EC). Tento dodatek Kosmetické směrnice 76/768/EEC (EEC, 1976) zavedl zákaz zkoušení finálních výrobků na zvířatech od 11.9.2004 a postupný zákaz uvádění na trh kosmetických prostředků, jejichž ingredience byly zkoušeny na zvířatech jinými než alternativními metodami po 11.3.2009. Pouze účinky ingrediencí z hlediska chronické toxicity, reprodukční toxicity a toxikokinetiky lze zkoušet konvenčními metodami na zvířatech do roku 2013 vzhledem k tomu, že v současnosti neexistují žádné alternativy in vitro k těmto zkouškám (EC, 2003).

Další požadavky na využití alternativních metod jsou zakotveny v nové evropské legislativě týkající se chemických látek REACH, tj. Nařízení týkající se registrace, hodnocení a autorizace chemických látek (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006). Cílem nařízení REACH je zajistit vysokou úroveň ochrany lidského zdraví a životního prostředí a zároveň podpořit rozvoj alternativních metod při hodnocení rizik u chemických

látek. Informace o toxicitě látek je nutné získávat především alternativními metodami, rovnocennými předepsaným konvenčním zkouškám, například pomocí kvalitativních a kvantitativních modelů vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR), pomocí metod in vitro či metod založených na toxikogenomice (EC, 2006).

Řada alternativních metod je založena na buněčných, organotypických a tkáňových kulturách, jejichž rychlý rozvoj započal již na začátku 20. století. V roce 1885 zakladatel tkáňových kultur Wilhelm Roux vyňal část neurálního ektodermu kuřecího embrya a udržel jej naživu ve vyhříváném fyziologickém roztoku po několik dní (Hamburger, 1997). V roce 1907 Ross Granville Harrison publikoval výsledky své práce se spinálními buňkami obojživelníků a položil tak základy metodologie buněčných kultur. Velký rozvoj této techniky byl zaznamenán ve 40. a 50. letech minulého století při virologickém výzkumu a následující masové produkci vakcín. Salkova vakcína proti poliomyelitidě byla jednou z prvních vyrobených touto technikou (Harrison a Rae, 1997).

Buněčná kultura je systém, v němž jsou za vhodných podmínek in vitro kultivovány nejčastěji eukaryotické savčí buňky. Prvním typem jsou primární buněčné kultury, vzniklé enzymatickým rozvolněním buněk tkání, které jsou následně kultivovány v prostředí kultivačního média (jde o směs různých typů buněk původní tkáně). Dalším typem jsou sekundární buněčné kultury neboli několikrát pasážované primární kultury. Třetím typem jsou buněčné linie, získávané cílenou selekcí z primárních kultur pomocí fyzikálních či chemických mutagenů nebo založené přímo na nádorových buňkách (např. buněčná linie HeLa pocházející z buněk nádoru děložního hrdla jedné dárkyně), které lze pasážovat bez omezení. Vzhledem ke snaze standardizovat postupy in vitro jsou nejčastěji pro alternativní metody používány imortalizované buněčné linie, dostupné ve sbírkách buněčných kultur. Evropská sbírka buněčných kultur (European Collection of Cell Cultures, ECACC) byla založena v roce 1984 jako servisní a referenční středisko pro vědeckou komunitu v Evropě. Adherentní buňky lze pěstovat na vhodně upraveném povrchu (např. plast pro tkáňové kultury, kolagenová matrice) a stimulovat jejich růst a diferenciaci. Tím dochází ke vzniku trojrozměrné tkáně, tzv. organotypické kultury, jež je biochemicky a fyziologicky bližší tkáni in vivo. Od 80. let minulého století probíhá ve světě vývoj trojrozměrných modelů různých tkání (kůže, rohovky, plicního a mukózního epitelu apod.), spojený s rozvojem a optimalizací řady nových alternativních toxikologických postupů.

Jedinou překážkou před zapracováním alternativních metod do legislativy je nutnost jejich formální validace, jež je definována jako proces, který ověří spolehlivost a relevanci určité metody pro daný účel, ať se jedná o zkoušku in vivo či in vitro (Balls et al., 1990).

Validační proces, předcházející přijetí metody do legislativního systému, by měl zahrnovat:

- jasně definovaný účel zkoušky a podrobný protokol
- důkaz o transferabilitě, tj. možnosti úspěšného přenosu postupu do jiné laboratoře
- informace o vyhovující intralaboratorní a interlaboratorní variabilitě výsledků
- definici predikčního modelu založeného na biostatistickém zpracování dat
- experimentální validační fázi zahrnující kruhový test v několika laboratořích, s dostatečným počtem zkoušených látek za slepých podmínkách
- nezávislé hodnocení výsledků validace
- definici oblasti využitelnosti, tj. pro jaký toxikologický cíl či typ materiálu je zkouška vhodná
- definici kritérií pro hodnocení charakteristik chování modelu včetně referenčních látek (Hartung et al., 2004).

Validační aktivity Evropského centra pro validaci alternativních metod v posledním desetiletí vedly k úspěšnému legislativnímu přijetí řady metod in vitro pro zkoušení lokální tolerance, tj. snášenlivosti pro kůži, oči a sliznice. Jako první metoda in vitro byla do nařízení stanovujícího metody pro zkoušení toxicity chemických látek a přípravků v rámci novelizace Směrnice Rady 67/548/EEC (EEC, 1967) v roce 2000 přijata zkouška fototoxicity in vitro 3T3 NRU, následovala zkouška kožní leptavosti na modelech EpiDermTM a EPISKINTM (2000), zkouška kožní absorpce in vitro (2004) a zkouška kožní dráždivosti na modelech lidské epidermis (2009). V databázi ECVAM byla shromážděna řada protokolů dalších, vědecky platných metod, jež jsou dostupné vědecké veřejnosti ve formě tzv. protokolů INVITTOX (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>). Všechny tyto metody lze využít při stanovení lokální tolerance (místní snášenlivosti) substancí přicházejících do styku s lidským organismem prostřednictvím kůže a sliznic např. ve smyslu kožní a oční dráždivosti či fototoxicity.

1.1. Kožní dráždivost

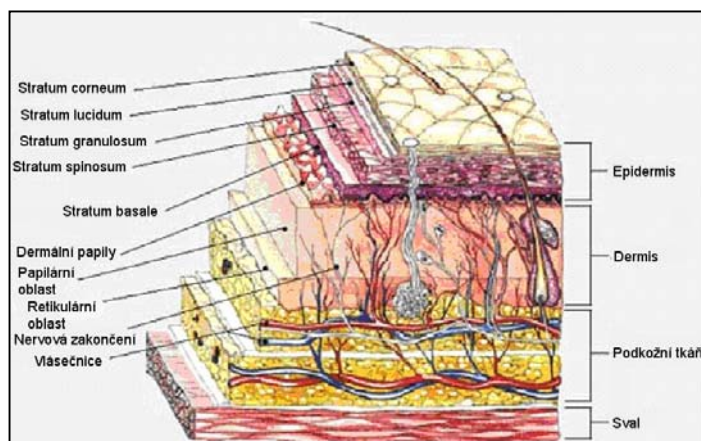
1.1.1. Kůže – struktura a funkce

Kůže je komplexní orgán pokrývající povrch těla, tvořící permeabilní bariéru vůči fyzikálním, chemickým a biologickým faktorům zevního prostředí. Kožní povrch dospělého člověka představuje plochu asi 2 m² a váhu až 15 kg. Kůže plní několik základních funkcí jako:

1. chemická bariéra fungující v obou směrech, ovlivňující ztráty vody, elektrolytů a dalších tělních složek, zamezující průniku nežádoucích či toxických látek ze zevního prostředí;
2. mikrobiologická bariéra zabráňující vstupu nežádoucích mikroorganismů;
3. radiační bariéra proti škodlivému UV záření, která je výsledkem produkce melaninu, syntetizovaného melanocyty v bazální vrstvě kůže po stimulaci UV zářením;
4. další funkce – např. regulace tělesné teploty, imunitní funkce (detekce antigenů, senzibilizace), ukládání a syntéza důležitých molekul (např. vitaminu D), exkrece a absorpce, sensorické vjemy jako tlak, teplota, bolest apod. (Wagner et al., 2002).

Kůže se skládá ze dvou vrstev – vnější pokožky (epidermis) a spodní škáry (dermis). S podkladem spojuje kůži podkožní vazivo (hypoderm). Součástí kůže jsou i vlasy, nehty a kožní žlázy (souborně kožní adnexa). V mukokutánních spojeních přechází kůže ve sliznici.

Epidermis tvoří vícevrstevný dlaždicový rohovějící epitel, obsahující převážně keratinocyty, dále Langerhansovy buňky, melanocyty, Merkelovy buňky a T-lymfocyty. Epidermis se dále dělí na stratum corneum (rohová vrstva), stratum granulosum, stratum spinosum a stratum basale. Ve ztlustělé vrstvě kůže na dlaních či ploskách nohou se objevuje také stratum lucidum (obr. 1).



Obr. 1: Anatomická struktura kůže (převzato z [http:// healthyskinbeauty.com](http://healthyskinbeauty.com))

Ochrannou bariéru kůže tvoří především keratinizovaná vrstva stratum corneum, která je nepřetržitě obnovována díky keratinocytům ze stratum basale, které se složitou diferenciací posunují směrem k povrchu, až se oddělí ve formě odumřelé rohové vrstvy. Tento proces se nazývá deskvamace a trvá 14-30 dní. Vysoce odolnou zrohovělou vrstvu pokožky (stratum corneum) tvoří 18-21 vrstev pevně spojených keratinizovaných buněk, bezjaderných korneocytů, v podobě plochých destiček se silnou keratinovou stěnou a hustými svazky keratinizovaných tonofilament (Klika, 1988). Korneocyty a intercelulární hmota složená ze specifických lipidů 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, dále jsou zde přítomny další organické sloučeniny a voda. Intercelulární prostor stratum corneum je vyplněn směsí specifických lipidů s malým množstvím vody. Lipidy jsou uspořádány do několika dvojvrstev 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).

Dermis neboli škára obsahuje řadu struktur, jako např. krevní vlasečnice, vlasové váčky, mazové a potní žlázy. Dělí se na část přilehlou k epidermis (papilární oblast) a níže ležící tzv. retikulární oblast. Buněčný základ dermis tvoří fibroblasty, dále makrofágy a mastocyty (žírné buňky). Fibroblasty vylučují kolagen, elastin a proteoglykany, které zajišťují pevnost a elasticitu kůže (Eckert, 1992).

Pod dermis se nachází podkožní tkáň, tvořená převážně adipocyty. Podkožní tukové vazivo je energetickou zásobou a působí jako mechanický a tepelný izolátor těla.

1.1.2. Dráždění kůže

Dráždění kůže neboli iritace, jak ji definuje Globálně harmonizovaný systém (GHS) klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (OSN, 2007), znamená vznik reverzibilního poškození kůže po aplikaci zkoušené látky až po dobu 4 hodin. Dráždění kůže je lokálně vznikající neimunogenní reakce, která se objevuje krátce po stimulaci. Její hlavní charakteristikou je reverzibilní proces zahrnující zánětlivé reakce a většinu klinických charakteristických příznaků dráždění (erytém, edém, svědění a bolest) souvisejících se zánětlivým procesem (Harvell et al., 1995).

Expozice kůže různým xenobiotikům, jako jsou chemické látky, léčiva nebo kosmetické prostředky, vede k řadě kožních reakcí. Látky pronikající rohovou vrstvou (stratum corneum) mohou způsobit rozklad lipidů a denaturaci proteinů (Welss et al., 2004). Po narušení rovnováhy lipidů dochází ke snížení bariérové funkce kůže, a tím k zvýšené transepidermální ztrátě vody a snadnější penetraci toxických látek k živým keratinocytům (Bouwstra et al., 2003). Některé chemikálie, např. povrchově aktivní látky (surfaktanty), v nižší koncentraci navozují poškození buněčných membrán, zatímco ve vyšších koncentracích způsobují lýzu buněk a uvolnění cytoplasmy do mezibuněčného prostoru (Partearroyo et al., 1990). Cytoplasma keratinocytů obsahuje prozánětlivý imunomodulátor cytokin IL-1 α , jehož uvolnění vede k sekundárním molekulárním reakcím, morfologickým změnám a nástupu typických symptomů kontaktní dermatitidy, např. erytému, edému, svědění či bolesti (Welss et al., 2004).

Dráždění může být navozeno také oxidativním stresem, kdy reaktivní formy kyslíku (ROS) způsobují buněčné poškození vlivem oxidace nukleových kyselin, proteinů a membránových lipidů, což vede ke změně genové exprese nebo přímé cytotoxicitě (Allen a Tresini, 2000; Rogers et al., 2001).

Reakce kůže po expozici toxickým látkám může být závislá na řadě dalších účinků, např. na změně lipidových dvojvrstev buněčných membrán (Welss et al., 2004) či modifikaci pružnosti membrán (Fulbright et al., 1997). Objasnění těchto mechanismů je zásadně důležité pro vývoj vhodných toxikologických zkoušek pro hodnocení kožní dráždivosti.

1.1.3. Zkoušení kožní dráždivosti

Zkoušení a klasifikace potenciálu kožní dráždivosti v minulosti výlučně zahrnovaly používání laboratorních zvířat (metoda B.4, Nařízení č. 440/2008 Sb.) tzv. Draizovým testem kožní dráždivosti na králících (ES, 2008).

Tato zkouška byla vyvinuta ve 40. letech 20. století pro predikci hazardu dráždivosti u látek a směsí, které přicházejí účelově nebo náhodně do kontaktu s lidskou kůží (Draize et al., 1944). Zvoleným experimentálním zvířetem se stal albinotický králík vzhledem k jednoduchému, finančně nenáročnému chovu a vysoce citlivé, snadno iritabilní kůži. Postupně došlo k řadě modifikací postupu této zkoušky, především se zkrátila expozice ze 24 hod na 4 hod a nebyla prováděna skarifikace kůže. Přes všechna vylepšení byla tato metoda nadále terčem kritiky, především pro nízkou prediktivitu a omezenou relevanci výsledků pro člověka (Phillips et al., 1972; Nixon et al., 1975), dále pro vysoce subjektivní hodnocení založené na vizuálním bodování reakcí a s tím spojenou špatnou

reprodukovatelnost výsledků (Weil a Scala, 1971). Hodnocení kožní dráždivosti navíc vychází pouze z bodování stupně erytému a edému, zcela opomíjí např. vezikulaci, tvorbu příškvaru či ulceraci. Přestože je touto zkouškou správně klasifikována většina silně dráždivých látek, řada substancí lehce dráždivá pro králíky nevyvolává žádné reakce u lidí. Podle některých studií je odhadováno, že až 40% látek nedráždivých pro člověka je klasifikováno Draizovým testem na králících jako dráždivé (Basketter et al., 2004).

V posledních letech je z etických, ekonomických i společenských důvodů především v Evropě kladen velký důraz na nahrazení zkoušek na zvířatech alternativními metodami. Tyto zásady jsou vtěleny jak do tzv. 7. dodatku Kosmetické směrnice (EC, 2003), tak do nové legislativy týkající se chemických látek REACH, tj. nařízení týkající se registrace, hodnocení a autorizace chemických látek (EC, 2006).

Značné množství finančních prostředků i úsilí renomovaných vědeckých pracovišť vedlo ke vzniku řady in vitro metod, nejčastěji využívajících imortalizované buněčné linie vzhledem k jejich vysoké standardizaci a nízkým nákladům při kultivaci. Pro zkoušení kožní dráždivosti však nejsou příliš vhodné, protože postrádají rohovou vrstvu a jsou příliš citlivé na expozici xenobiotikům. V posledních letech došlo k velkému rozvoji produkce rekonstruované lidské epidermis, původně vyvíjené především pro léčbu popálenin. Některé trojrozměrné modely lidské kůže byly později modifikovány pro zkoušení dermatotoxického potenciálu chemických látek či léčiv (Roguet a Schaefer, 1997).

Modely rekonstruované lidské kůže lze v zásadě použít pro zkoušení všech typů lokální toxicity, tj. kožní leptavosti, dráždivosti, penetrace a fototoxicity. V současné době je na světovém trhu dostupná řada kožních modelů, např. EPISKINTM a SkinEthic RHE (L'Oréal, Francie), EpiDermTM (Mattek, USA), ESR-1000TM (Cell Systems GmbH, Německo) a PhenionTM (Phenion GmbH, Německo). Vedle epidermálních modelů tvořených keratinocyty jsou dostupné i komplexní modely obsahující epidermis i dermis (tzv. "full-thickness" modely obsahující keratinocyty i fibroblasty), či speciální modely s funkčními melanocyty. Jsou vyvíjeny i další specializované modely, např. EpiOcularTM simulující tkáň rohovky pro zkoušení oční dráždivosti, EpiVaginalTM na bázi slizničního epitelu či EpiOralTM odvozený od mukózy ústní dutiny (<http://www.mattek.com>).

Lidské keratinocyty a fibroblasty, buněčný základ rekonstruované kůže, pocházejí většinou z biopsií. Nejčastěji je užívána tkáň z juvenilní předkožky. Po separaci epidermis od dermis je připravena suspenze jednotlivých typů buněk. Oddělené keratinocyty jsou poté nasazeny na vhodný substrát, např. na kolagenovou matici (model EPISKINTM) či inertní filtry složené z acetylcelulózy nebo polykarbonátu (modely EpiDermTM a SkinEthic RHE).

Po uchycení buněk na substrátu jsou kultury inkubovány několik dní v kultivačním mediu, obsahujícím např. sérum, hormony, vitaminy či růstové faktory, aby došlo k proliferaci a vzniku mnohvrstevné tkáně. Následně jsou kultury vyzdviženy a exponovány vzduchu (přechod voda-vzduch), čímž je stimulována diferenciace keratinocytů, vedoucí až ke vzniku funkční rohové vrstvy (Prunieras et al., 1983, Régnier et al., 1993).

Modely rekonstruované lidské epidermis svým celkovým uspořádáním věrně napodobují biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. epidermis včetně stratum corneum. Princip zkoušky na modelu rekonstruované lidské epidermis je založen na předpokladu, že dráždivé látky jsou schopny proniknout přes stratum corneum difúzí a že jsou cytotoxické pro buňky v podkladových vrstvách. Životaschopnost buněk se měří na základě přeměny vitálního barviva MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2*H*-tetrazolium-bromid) účinkem dehydrogenázy v živé tkáni na sůl modrého formazanu, jehož množství koreluje s celkovým počtem nebo vitalitou živých buněk a kvantitativně se měří po extrakci z tkání (Mosman, 1983). Dráždivé látky se identifikují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (např. 50% životnosti oproti kontrole v případě modelů EPISKINTM a EpiDermTM).

Zkouška kožní leptavosti (korozivity) využívající modely rekonstruované epidermis byla úspěšně validována (Fentem et al., 1998) a přijata do legislativy již v roce 2004 (OECD, 2004; ES, 2008b). Dodatečná validace (tzv. "catch-up study") modelu EpiDermTM pro zkoušení kožní leptavosti (Liebsch et al., 2000) ukázala, že trojrozměrné modely kůže vedou k podobným výsledkům, pokud mají společné strukturální a funkční atributy. Proto byl vydán metodický pokyn OECD TG431 definující kritéria kvality nového kožního modelu, aby byl vědecky přijatelný a mohl být zařazen do validačního procesu. Model musí být založen na keratinocytech, které tvoří mnohvrstevnou tkáň pod funkční rohovou vrstvou, s dostatečnou bariérou proti průniku cizorodých látek. Životnost je obvykle kvantifikována s použitím vitálního barviva (např. MTT nebo jiné metabolicky přeměněné barvivo). Optická hustota extrahovaného barviva musí být aspoň 20x vyšší než optická hustota extrakčního činidla. Hodnota životnosti negativní kontroly musí být stabilní po celou dobu zkoušky. Stratum corneum musí být dostatečně odolné proti průniku některého z cytotoxických markerů (např. 1% Triton X-100). Tuto vlastnost lze ověřit např. určením doby expozice markeru, která snižuje životnost na 50% oproti kontrole (ET50). Výrobce by měl kontrolovat, že jednotlivé tkáně poskytují reprodukovatelné výsledky nejen v čase, ale i v různých laboratořích (OECD, 2004).

Po úspěšné validaci zkoušky kožní leptavosti na trojrozměrných modelech lidské kůže zahájil ECVAM v roce 2003 validační proces se třemi nejnadějnějšími metodami in vitro pro zkoušení kožní dráždivosti, a to se zkouškou funkční integrity kůže SIFT-Skin Integrity Function Test (Heylings et al., 2003) a dvěma postupy využívajícími rekonstruované kožní modely (model EpiDermTM od firmy MatTek, USA, a model EPISKINTM od firmy L'Oréal, Francie). Pro oba modely rekonstruované epidermis byl vypracován společný protokol s 15 minutovou aplikací a 42 hodinovou post-inkubací (Kandárová et al., 2005; Cotovio et al., 2005).

Vzhledem k tomu, že Draizův test kožní dráždivosti je dosud jedinou právně závaznou zkouškou pro klasifikaci a značení chemických látek, rozhodl management validační studie použít výsledky na králících jakožto zlatý standard (Eskes, 2007). Přestože je klasifikace kožní dráždivosti chemických látek prováděna z hlediska jejich účinků na člověka, při této validaci alternativních metod nebyly vzaty do úvahy žádné údaje z humánní praxe, ani při plánování a výběru referenčních látek, ani při hodnocení výsledků. Není proto překvapivé, že v průběhu validační studie obě zkoušky dráždivosti na modelech lidské kůže, které strukturálně obsahují lidské buňky, klasifikovaly některé substance odlišně oproti Draizovu testu, čímž se pro modely snížila jejich výsledná citlivost i celková přesnost (Spielmann et al., 2007).

Výsledkem validační studie bylo přijetí zkoušky na modelu EPISKINTM jakožto plnohodnotné náhrady zkoušky kožní dráždivosti na králících. Model EpiDermTM vykazoval vysokou specifičnost, ale nižší citlivost, a proto byl validován jako zkouška in vitro pro klasifikaci neiritantů. Bylo rozhodnuto, že je nutné optimalizovat užitý protokol tak, aby se zlepšila predikční schopnost této zkoušky klasifikovat iritanty (ECVAM, 2007).

Modifikace protokolu ve smyslu prodloužení doby expozice z 15 min na 60 min vedla ke zlepšení výsledků a v následné zkrácené validační studii (tzv. "catch-up study") byla zkouška na modelu EpiDermTM pod označením EpiDermTM SIT validována jako další plnohodnotná náhrada Draizova testu při zkoušení kožní dráždivosti (ECVAM, 2008). Zkouška dráždění kůže in vitro byla přijata do evropské legislativy jako metoda B.46 Dráždění kůže in vitro: zkouška pomocí modelu rekonstruované lidské epidermis (ES, 2009).

Validační studie alternativních metod jako zlatý standard vesměs využívají výsledky z experimentů na zvířatech, přestože jejich relevance pro člověka je diskutabilní a množství údajů z experimentů je v některých případech nedostatečné (např. klasifikace kožní dráždivosti chemických látek je v mnoha případech založena na výsledcích ze 3 zvířat v jedné laboratoři). Vzhledem k dlouhodobému nedostatku plně relevantních dat pro člověka byl

Dr. Basketterem a jeho kolegy vyvinut postup pro etické a bezpečné zkoušení potenciálu kožní dráždivosti ve skupině dobrovolníků (Basketter et al., 1997; Robinson et al., 1999; Basketter et al., 1999). Tato čtyřhodinová zkouška dráždivosti s využitím okluzivních náplastí, tzv. 4h Human Patch Test (4HPT), je založená na zkoušení chemických látek v postupně se zvyšujících aplikačních dobách od 15 min až po 4 hod. I slabá kožní reakce ve formě erytému a edému znamená ukončení zkoušky a delší expozice není prováděna, takže nedochází ke vzniku závažných projevů kožní iritace. V 90. letech minulého století byla realizována řada klinických studií ve skupině dobrovolníků za účelem srovnání výsledků dráždivosti u králíků a u lidí (Robinson et al., 1999; Basketter et al., 2004). Tyto studie potvrdily, že Draizova zkouška kožní dráždivosti na králících v mnoha případech přeceňuje předpokládané reakce u lidí a proto by neměla být exkluzivní a jedinou metodou pro identifikaci hazardu dráždivosti nových substancí (Patil a Patrick, 1998).

1.2. Oční dráždivost

1.2.1. Oko - struktura a funkce

Struktura lidského oka jakožto orgánu zraku je přizpůsobena potřebě zaostřit paprsek světla na sítnici (retina). Všechny části oka, přes které paprsek světla prochází, jsou průhledné, aby co nejméně zabraňovaly rozptylu dopadajícího světla. Rohovka (cornea) a čočka (lens) pomáhají paprsek světla spojit a zaostřit na zadní stěnu oka – sítnici. Dopadající světlo pak způsobuje chemické přeměny ve světločivných buňkách (tyčinky a čípky), které vysílají nervové impulsy zrakovým nervem (nervus opticus) do mozku. Světlo vstoupí přes rohovku, do oblasti vyplněné komorovou vodou (humor aquosus), a dopadá na čočku skrz panenku (pupila, zornice). Ta se pomocí svalů (duhovka, iris) roztahuje a zužuje, čímž reguluje množství procházejícího světla. Pomocí svalů je také regulována čočka, která zaostřuje paprsky, aby se sbíhaly přesně na sítnici, kde vytvářejí převrácený obraz. Celá zbývající oblast oka je vyplněna sklivcem (corpus vitreum), který udržuje v oku stálý tlak a tím i tvar (<http://www.ocnivady.cz/anatomie-lidskeho-oka.p49.html>). Anatomie oční koule je znázorněna na obr. 2.

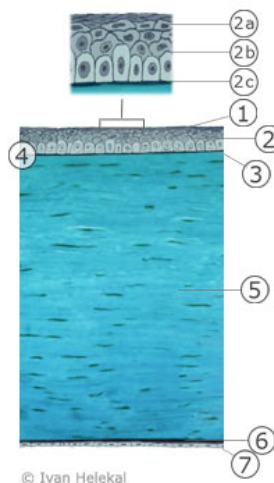


Obr. 2: Anatomie oka (převzato z www.kst.cz/web/wp-content/organy/oko-prurez.jpg)

Rohovka spolu se sklérrou tvoří vnější obal oka, podílí se na udržení jeho tvaru a ochraně vnitřních částí před mechanickým poškozením či vstupem infekce. Průměrná velikost rohovky je 10–12 mm, její tloušťka dosahuje v centrální části asi 0,5 mm, směrem k okrajům

se ztlušťuje. Skládá se z šesti vrstev: epitelu, bazální membrány, Bowmanovy vrstvy, stromatu, Descemetovy membrány a endotelu (obr. 3).

1. slzný film
2. epitel
 - o 2a - povrchové buňky
 - o 2b - kubické buňky
 - o 2c - bazální cylindrické buňky
3. bazální membrána
4. Bowmanova vrstva
5. stroma
6. Descemetová blána
7. endotel



Obr. 3: Anatomická stavba rohovky (převzato z <http://www.ocnivady.cz/anatomie-lidskeho-oka.p49.html>)

Epitel tvořící vnější část rohovky se skládá z 5–6 vrstev buněk. Pod 2–3 řadami povrchových plochých buněk se nacházejí 2–3 řady buněk kubických, na bazální membránu nasedá vrstva buněk cylindrických, které jsou schopny buněčného dělení (proliferace). Dělicí se buňky se vyvíjejí v buňky kubické a putují k povrchu epitelu. Odumírající buňky se odlupují z povrchu oka a jsou odplavovány slzami. Epitel rohovky se především při rozsáhlejším poškození obnovuje i na základě dělení kmenových buněk nacházejících se v limbu (hraniční oblast mezi rohovkou a sklérou).

Bazální membrána je tvořená především kolagenem a lamininem, které jsou produkovány epitelem rohovky. V případě narušení epitelu chrání bazální membrána oko před vstupem infekce či mechanickým poškozením.

Bowmanova vrstva uložená pod epitelem se skládá z plsti kolagenních mikrofibril zalitých do hmoty amorfní. Při poranění tato membrána na rozdíl od epitelu znovu neregeneruje.

Stroma (substantia propria corneae) tvoří nejpodstatnější složku rohovky. Jedná se o velmi ploché fibroblasty tvořící vazivovou tkáň, ve které kolagenní fibrily tvoří vrstvené tenké lamely vyplněné mukopolysacharidy. Rozhodující roli v průhlednosti rohovky hraje požadovaný konstantní obsah vody v rohovkovém parenchymu. V těchto pochodech sehrávají

svou úlohu endotel, epitel a obě membrány. Zvýšením obsahu vody dojde ke zbobtnání mukopolysacharidů, jednotlivé fibrily se roztlačí a rohovka se zakalí (Kvapilíková, 2000).

Descemetská blanka má charakter bazální blanky, je produktem zadního mezenchymového epitelu rohovky.

Zadní epitel rohovky (endotel) je tvořen mozaikou většinou hexagonálních plochých buněk o tloušťce asi 5 μm . Endotel rohovky je metabolicky vysoce aktivní, zásobení živinami je zajištěno průchodem z komorové tekutiny.

Zevní okraj skléry překrývá okraj rohovky. Na okraji zevní plochy rohovky přechází rohovkový epitel ve vícevrstevný epitel spojivky očního bulbu. Spojivka (tunica conjunctiva) má charakter sliznice, je vystlána vícevrstevným epitelem cylindrickým s pohárkovými buňkami a endoepitelovými žlázkami mucinózního charakteru. Je zásobena krví ciliárním cévním systémem (Klika, 1988).

1.2.2. Dráždění oka

Z toxikologického hlediska jsou nejdůležitější části oka přicházející do kontaktu s prostředím, tj. rohovka, spojivka a duhovka. Asi 80% struktury rohovky je tvořeno rohovkovým stroma, jež zajišťuje průchod světla díky vysoké organizovanosti makromolekul a požadovanému stupni hydratace (70-80%). Narušení této rovnováhy vede k otoku a zakalení. První fyzikální bariéru proti vstupu exogenního materiálu do oka tvoří přední epitel rohovky, který má regenerační schopnosti. Menší podráždění je reverzibilní, pokud se buňky epitelu přeskupí a zakryjí poraněnou oblast, nebo jsou vytvořeny nové buňky v důsledku buněčného dělení. Naopak narušení vnitřní endotelové membrány je nevratné a může vést až k trvalé slepotě (Curren a Harbell, 1998).

Další citlivou částí oka je spojivka, která kryje vnější část oka a vnitřní povrch víček. Je bohatě prokrvená, zajišťuje zvlhčení oka a obsahuje žlázy vylučující komponenty slzného filmu. Při podráždění dochází k zánětlivým procesům, dilataci vlásečnic, změnám v permeabilitě vlásečnic vedoucím k průniku tekutiny do intersticiálního prostoru a tím k otoku. Tyto jevy jsou do značné míry reverzibilní. Slabé iritanty mohou způsobit pouze zánět spojivky bez poškození rohovky.

Třetí důležitou částí oka je duhovka (iris), jejíž konstriktce či dilatace reguluje množství světla pronikajícího na sítnici. Duhovka je prokrvená tkáň uložená za rohovkou. Její podráždění vede k dilataci vlásečnic, průsaku tekutiny a následnému otoku. Snížení schopnosti reakce na světlo vede k těžkému poškození zraku (Hackett a McDonald, 1994).

1.2.3. Zkoušení oční dráždivosti

Vzhledem k tomu, že chemická látka může mít vliv na tři různé typy tkání v oku, je hodnocení dráždivosti xenobiotik obtížné. Látka má dráždivé účinky na oči, pokud po aplikaci na přední povrch oka vyvolá změny, které jsou plně vratné do 21 dnů po aplikaci. Látka má leptavé účinky na oči, pokud jednorázová aplikace na přední část oka vyvolá poškození oční tkáně nebo fyzické zhoršení vidění, které není plně reverzibilní do 21 dnů po aplikaci (ES, 2008a).

Zkouška oční dráždivosti na králících, publikovaná již v roce 1944 (Draize, 1944), vychází z numerického bodování stupně poškození jednotlivých tkání a následného váženého výpočtu celkového skóre dráždění. Zkoušená látka je aplikována na přední část oka, druhé oko slouží jako kontrola. Poškození spojivky, rohovky a duhovky je standardním způsobem bodováno 1, 24, 48 a 72 hod po aplikaci. Reverzibilita reakce je důležitým parametrem a je sledována po dobu 21 dní. Tato zkouška se stala předepsanou standardní metodou pro hodnocení oční dráždivosti (ES, 2008a), přestože je známo, že hodnocení stupně poškození je vysoce subjektivní, variabilita reakcí jednotlivých experimentálních zvířat vysoká a reprodukovatelnost výsledků nízká (Earl et al., 1997).

S rozvojem poznání a vzrůstající tendencí nahrazovat zkoušky na zvířatech alternativními metodami narůstá i potřeba vyvinout a validovat zkoušky oční dráždivosti in vitro. V současné době neexistuje jediná plně validovaná a legálně akceptovaná zkouška oční dráždivosti in vitro pro klasifikaci chemických látek. Řada metod, založených na buněčných, tkáňových nebo organotypických modelech, však existuje desítky let a různé metody in vitro jsou používány jako screening při vývoji nových látek.

Nejbližší k situaci in vivo je zkouška na izolovaném králíčím (IRE – Isolated Rabbit Eye) nebo slepičím oku (ICE – Isolated Chicken Eye), kdy látka je aplikovaná přímo na oční bulvy získané jako odpad v potravinářském průmyslu. Další skupina zkoušek využívá pouze rohovku, která je považována za rozhodující bariéru při poškození oka. Zkouška BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) je založena na měření změn opacity a permeability bovinní rohovky po aplikaci zkoušené látky. V roce 2007 Vědecký výbor ECVAM schválil použití zkoušky BCOP a ICE pro klasifikaci korozivních a silně dráždivých látek v EU (ECVAM, 2007a) a obě metody byly zapracovány do systému metodických doporučení OECD jako TG 437 a TG 438 (OECD, 2009, 2009a).

Další přístup k hodnocení oční dráždivosti představují rekonstruované trojrozměrné modely tkání, např. model rohovky EpiOcularTM od firmy MatTek (USA), či model HCE (Skinethic, Francie). Struktura modelu simuluje epiteliální povrch rohovky a její narušení lze

hodnotit jako snížení životnosti tkání, uvolnění prozánětlivých mediátorů či změn permeability po aplikaci zkoušené látky. Výsledky ukazují, že tyto modely mají vysokou predikční schopnost v případě slabých a středních iritantů (Stern et al., 1998) a v blízké době je očekávána validační studie ECVAM zaměřená na tyto modely.

Zkouškou hodnotící akutní poškození spojivky je test HET-CAM (Hen's Egg – Chorioallantoic Membrane), využívající jako substrát vysoce prokrvenou chorioalantoidní membránu fertilizovaného slepičího vejce. Stupeň poškození je vypočítán podle času nutného k vyvolání hemoragie, lýzy a koagulace pozorované na membráně do 5 minut po aplikaci látky (Luepke, 1985). Tato zkouška je doporučena ECVAM pro screening oční dráždivosti (protokol INVITTOX č.47, dostupný online na <http://ecvam-dbalm.jrc.cec.eu.int>), ale před možným zařazením do validačního procesu je nutné zpřesnění protokolu a rozšíření skupiny zkoušených látek.

Vzhledem k tomu, že narušení rohovky vede ke zvýšenému průniku xenobiotik do rohovkového stroma a tím k závažnému poškození dalších struktur oka, je považováno poškození rohovky za nejdůležitější parametr oční iritace (Maurer et al., 2002). Proto vznikla řada metod založených na buněčných kulturách, simulujících epitel vnější části oka. Jedná se např. o zkoušku průniku fluoresceinu monolayerem buněk (Fluorescein Leakage Test), hodnotící narušení pevných vazeb mezi epiteliálními buňkami, nebo zkoušky cytotoxicity založené na uvolnění neutrální červeně (Neutral Red Release) nebo příjmu neutrální červeně (Neutral Red Uptake) po aplikaci testované látky.

Zkouška Neutral Red Release je založena na skutečnosti, že jedním z mnoha okamžitých toxických účinků některých látek je poškození buněčné membrány, které se projeví jako únik intracelulárního obsahu. Pokud jsou buňky předem naplněny vitálním barvivem a poté krátkodobě (1 min) exponovány toxickému působení, množství uvolněného barviva z buněk odpovídá stupni poškození membrán, a tak poskytuje informaci o míře toxicity. Jako substrát jsou používány myší fibroblasty 3T3 Balb/c, které jsou kultivovány do stadia plné konfluence. Bylo zjištěno, že v tomto stavu nejvíce připomínají buňky na povrchu oka oproti buňkám, které jsou ve fázi rychlého množení (Reader et al., 1990). Tato metoda byla předmětem řady prevalidačních studií s cílem nalézt alternativní metodu oční dráždivosti k Draizově testu na zvířatech (Balls et al., 1995). V roce 2009 proběhla retrospektivní validační studie čtyř buněčných metod včetně NRR dle protokolu INVITTOX č.54 pro nahrazení zkoušek oční dráždivosti na králících. Vědecký výbor ECVAM vydal závěrečné prohlášení, v němž je uvedeno, že tato metoda nemůže být zatím doporučena jako plnohodnotná náhrada testu na zvířatech vzhledem k nedostatkům v parametrech reprodukovatelnosti, transferability

a oblasti použití této zkoušky (ECVAM, 2009).

Zkouška příjmu neutrální červeně (Neutral Red Uptake) umožňuje hodnotit bazální toxicitu a iritační potenciál látek pomocí měření množství vitálního barviva (neutrální červeně, NR), které proniká membránami a akumuluje se v lysozomech živých buněk. Změny buněčného povrchu nebo narušení citlivých lysozomálních membrán vedou ke snížení příjmu a vazby NR živými buňkami. Pokud jsou buňky exponovány po 24 hod zkoušené látky, následný příjem neutrální červeně odpovídá stupni poškození buněčné kultury, a tak poskytuje informaci o počtu živých, poškozených či mrtvých buněk (Babich a Borenfreund, 1990).

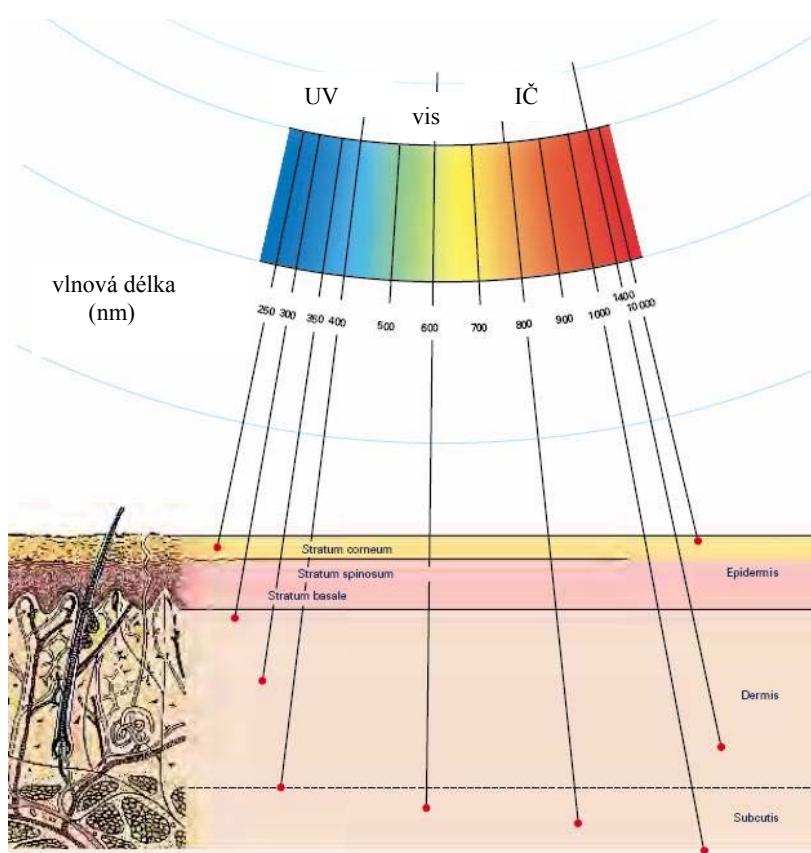
Každá z výše zmíněných alternativních metod hodnotí specifický typ poškození a nemůže postihnout všechny aspekty komplexního působení xenobiotik na oko. Proto vývoj těchto metod vede ke snaze vytvořit baterii zkoušek, jež by se doplňovaly tak, aby byla pokryta celá škála projevů oční dráždivosti in vitro (Grindon et al., 2008).

Skupina expertů ECVAM v roce 2010 vytvořila strategii zkoušení oční iritace in vitro, vycházející z baterie zkoušek zaměřených na 4 typy mechanismu účinku chemických látek. Jedná se o lýzu membrán (narušení membránové integrity působením povrchově aktivních látek, např. tenzidů), koagulace (precipitace či denaturace makromolekul charakteristická pro působení kyselin, louhů či organických rozpouštědel), saponifikace (štěpení lipidů) a účinek na makromolekuly, tj. alkylace či oxidace esenciálních bílkovin či nukleových kyselin působením peroxidů, epoxidů či oxidačních bělidel (Jester, 2006). Expertní skupina dospěla k závěru, že úspěšné nahrazení zkoušek oční dráždivosti na zvířatech baterií zkoušek in vitro závisí na lepším poznání mechanismu účinku chemických látek, systematické kompilaci a hodnocení existujících údajů z Draizova testu a využití všech dostupných dat z humánní praxe. Teprve validace jednotlivých alternativních metod, vytvoření relevantních predikčních modelů a pokrytí všech mechanismů účinku povede k legislativnímu zapracování baterie zkoušek a jejich využití při klasifikaci hodnocení rizika chemických látek. (Scott et al., 2010).

1.3. Biologické účinky slunečního záření - fototoxicita

1.3.1. Účinky slunečního záření na organismus

Sluneční záření je elektromagnetické vlnění obsahující několik složek, které mají různý biologický účinek. Sluneční paprsky pronikající do atmosféry obsahují ultrafialové (UV) záření, viditelné světlo a infračervené (IČ) paprsky (obr. 4). Atmosféra funguje jako ochranný deštník, který brání průniku nejškodlivějších složek slunečního spektra. Hlavním filtrem je ozónová vrstva, dalšími faktory jsou částice prachu, kouř a oblaka.



Obr. 4: Průnik slunečního záření do kůže (převzato z www.missionignition.net/bms)

Z hlediska biologické účinnosti má největší význam UV složka slunečního záření. Podle vlnové délky se rozděluje do tří oblastí: UVC (100 - 290 nm), UVB (290 - 320 nm) a UVA (320 - 400 nm).

Záření UVC, složka UV záření o nejkratší vlnové délce, je životu na zemi nebezpečná. Ačkoli je zatím jeho průniku zabráněno tím, že je zcela absorbováno atmosférou, obava z jeho vlivu na živé organismy v důsledku ztenčování ozónové vrstvy stoupá.

Asi 60% záření UVB je filtrováno ozónovou vrstvou atmosféry, zbytek dopadá na zemský povrch. Po dopadu na kůži záření proniká do pokožky, do horní části dermis zasáhne však jen velmi malá část (asi 10%). UVB záření vyvolává syntézu vitaminu D, způsobuje hnědé zbarvení kůže efektem pozdní pigmentace, tj. stimulace melanocytů ke tvorbě melaninu, a navozuje ztlustění kůže (hyperplasie). Při nadměrné dávce UVB záření způsobuje zarudnutí kůže (erytém), ještě vyšší expozice má za následek spálení pokožky. Záření UVB se podílí na vzniku volných radikálů a reaktivních forem kyslíku, které způsobují poškození buněčných makromolekul včetně DNA, a tak přispívá k předčasnému stárnutí kůže (tzv. photoageing), imunosupresi či vzniku zhoubného onemocnění kůže (Guarrera, 1988).

Díky větší vlnové délce se dostává UVA záření hlouběji do kůže, do dermis jej pronikne asi 40%. Biologickým účinkem UVA záření na pojivo dermis je tzv. elastoidní degenerace, jejímž následkem je předčasné stárnutí kůže. UVA záření se také podílí na tvorbě volných radikálů, při dlouhodobějším působení narušuje imunitní mechanismy a umožňuje rozvoj nádorových onemocnění kůže. Fotooxidací melaninu přítomného v epidermis způsobuje časnou pigmentaci kůže.

Sluneční záření o vlnové délce mezi 400 - 700 nm je označováno jako viditelné světlo, záření v pásmu nad 700 nm je označováno jako infračervené a má výrazné tepelné účinky. Zatím nebyly popsány žádné negativní účinky těchto dvou typů záření (De Polo, 1998).

1.3.2. Ochrana kůže před slunečním zářením

K přirozeným faktorům ochrany kůže patří především tloušťka epidermis a úroveň melaninové pigmentace. Rohová vrstva nejen absorbuje a odráží dopadající UV záření, ale také oslabuje jeho rozptyl díky keratinu s absorpčním maximem mezi 290 - 320 nm (Ettler, 2004). Melanin chrání kůži díky rozptylu a absorpci UV záření, jež přeměňuje na tepelnou energii, zároveň funguje jako lapač volných radikálů vznikajících v kůži po ozáření (Kullavanijaya a Lim, 2005). Přestože zdravá kůže obsahuje účinný obranný systém proti slunečnímu záření i oxidativnímu stresu, nadměrná expozice UV záření může překonat antioxidační a reparační kapacitu kůže a vést k oxidativnímu poškození, imunosupresi až karcinogenezi.

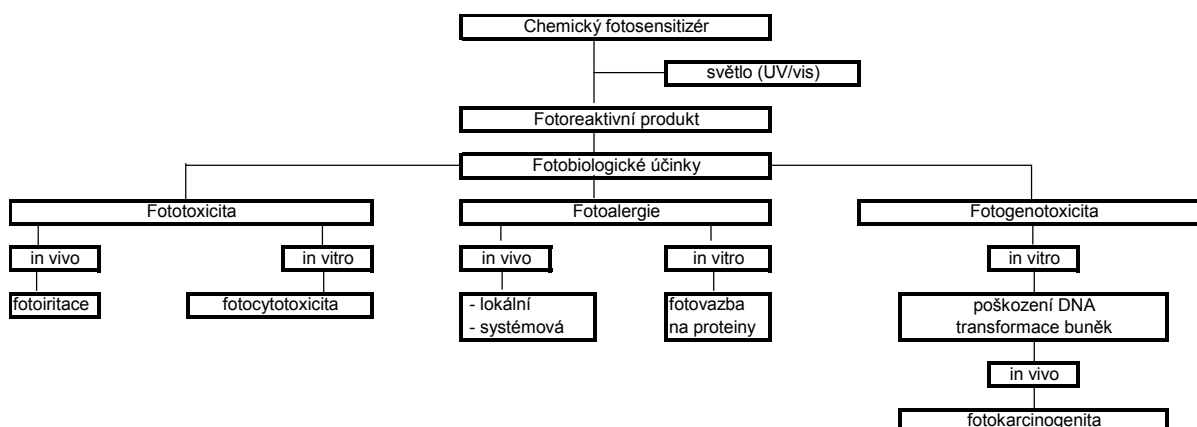
Silnému působení slunečního světla je možné se vyhýbat např. pobytem ve stínu, ochranným oděvem či nanášením fotoprotektivních přípravků přímo na kůži. Moderní prostředky na slunění (tzv. sunscreens) ve formě olejů, krémů či gelů obsahují UV filtry poskytující širokospektrální ochranu proti UV záření. Podle mechanismu účinku lze UV filtry rozdělit na chemické a fyzikální. Chemické filtry jsou organické sloučeniny (např. cinnamáty,

benzofenony, salicyláty), jež transformují vysokoenergetické UV záření na neškodné dlouhovlnné záření o vlnové délce nad 380 nm a přeměňují je na teplo. Fyzikální filtry jsou nerozpustné látky anorganické povahy (např. oxid titaničitý). Jejich funkce je založena na rozptylu, odrazu a/nebo absorpci UV záření (Draelos, 1995).

Používání UV filtrů jakožto ingredience kosmetických prostředků je v zemích Evropského společenství regulováno Evropskou směrnicí pro kosmetické prostředky (Směrnice Rady 76/768/EEC). Příloha č.7 povoluje v současné době 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, SCCNFP, 2003). Soubor informací o bezpečnosti nového UV filtru musí zahrnovat výsledky provedených zkoušek zaměřených na akutní, subchronickou a chronickou toxicitu, kožní a oční dráždivost, senzibilizaci, perkutánní absorpci, fototoxicitu/fotosenzibilizaci, toxicitu pro reprodukci a karcinogenitu. Pouze ingredience s bezpečným toxikologickým profilem a vypočítanou hranicí bezpečnosti ("Margins of Safety") s hodnotou vyšší než 100 mohou být schválené pro použití v humánní praxi (Nohynek a Schaefer, 2001).

1.3.3. Fotosensibilizace

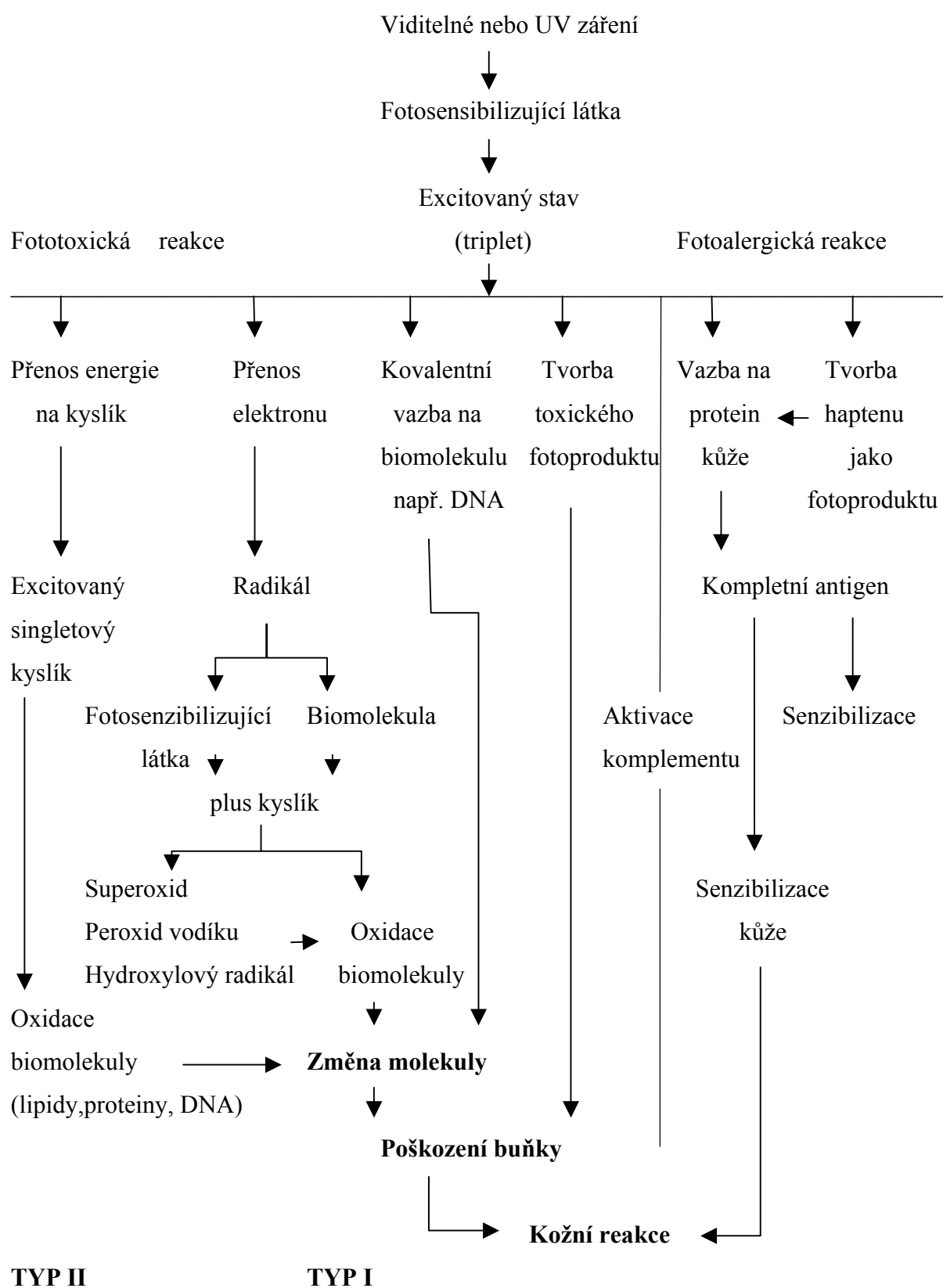
Jedním z nežádoucích účinků slunečního záření je fotosensibilizace, která je definována jako proces, při němž jsou vyvolány nežádoucí toxické kožní reakce na jinak běžně neúčinné dávky záření účinkem specifické látky, absorbující záření specifické vlnové délky (tzv. fotosensitizer). Podle mechanismů, které se uplatňují při poškození organismu, se reakce dělí na fototoxické (fotoiritační), fotoalergické a fotogenotoxické (obr. 5).



Obr. 5: Fotobiologické účinky (podle Spielmann et al., 2000)

Fototoxicita je definována jako toxická odezva kůže na látku aplikovanou na tělo, která je vyvolána nebo zvýšena (a je zjevná při nižších úrovních dávek záření než obvykle) po následné expozici světlu, nebo která je vyvolána ozářením kůže po systémovém podání látky (ES, 2008c). Fotosensibilizace může být vyvolána řadou chemických látek či léčiv, které vstupují do organismu ingescí, inhalací či topickou aplikací na kůži. Podle literárních zdrojů existuje asi 15 000 látek v životním prostředí, včetně léčiv, látek rostlinného původu či ingrediencí spotřebních výrobků, které vykazují fotosenzitivní potenciál a vedou k vystupňovaným kožním reakcím na sluneční záření (Spielmann et al., 1994). Pravděpodobnost fototoxické reakce závisí na dostatečné absorpci a distribuci látky v tkáních a je snížena fungující detoxikací a exkrecí organismem. Většina fotosensitizerů reaguje na UVA záření, existuje však i řada látek se specifickou reakcí na UVB záření nebo na záření z oblasti viditelného spektra, např. v případě barviv (Marzulli a Maibach, 1987).

Předpokladem fotosensibilizace je absorpce fotonu UV/vis záření fotoaktivní molekulou, která vede ke vzniku nestabilního excitovaného stavu, tj. singletu či tripletu. Většina fotosensibilizačních oxidačních reakcí je spojena s tripletovým stavem fotosensitizeru vzhledem k jeho relativně delšímu času rozpadu (obr. 6).



Obr. 6: Mechanismy fotosensibilizace (podle Spielmann et al., 1994)

V závislosti na typu fotoaktivní látky, charakteru biologického substrátu (např. nukleová kyselina, protein, část membrány) a na reakčních podmínkách (např. pH, obsah kyslíku) dochází ke dvěma typům fotochemické reakce. Při fotochemické reakci typu I sensitizér v tripletovém stavu předává svou energii přímo biologickému substrátu, čímž dochází k produkci volných radikálů, reagujících s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2), hydroxylového radikálu ($OH^{\cdot}$) a dalších reaktivních forem kyslíku (ROS). Při fotochemické reakci typu II dochází k energetickému transferu ze sensitizéru v tripletovém stavu na kyslík v základním stavu. Vznikající singletový kyslík je vysoce reaktivní a jeho oxidační účinek poškozuje buněčné membránové struktury a makromolekuly včetně nukleových kyselin, lipidů či proteinů (Spielmann et al., 1994).

Na principu fotobiologického účinku některých fotoaktivních látek je založena fotodynamická léčba nádorů. Fotosensibilizující látky, které jsou přednostně vychytávány v patologicky změněné tkáni a následně ozářeny zářením odpovídající vlnové délky, navozují oxidaci membránových lipidů a proteinů, vedoucí k cytolyze a destrukci tumorů (Brown et al, 1999; Kolářová et al., 2007).

Typickými klinickými projevy dermální fotoiritace je erytém, edém, vezikulace (tvorba puchýřků), svědění, zvýšená teplota kůže a přetrvávající hyperpigmentace. Během zánětlivého procesu dochází k uvolnění histaminu, kininů, derivátů kyseliny arachidonové a prostaglandinů (Marzulli a Maibach, 2004). První příznaky vznikají často již během několika minut až hodin po ozáření, s následným olupováním a sklonem k trvalejším skvrnitým hyperpigmentacím (Ditrichová, 2008).

Fototoxická je nežádoucí vedlejší reakce u řady léků, potvrzená např. u antibiotik a chemoterapeutik (tetracyklin, gentamycin, sulfonamidy aj.), u nesteroidních antiflogistik (ketoprofen, piroxicam), cytostatik, diuretik, antimalarik na bázi chinolinu či některých psychofarmak (např. chlorpromazin, haloperidol). První patologické reakce na sluneční světlo byly popsány již během II. světové války při užití lokálních sulfonamidů k léčbě válečných zranění. Fototoxické reakce po zevním kontaktu jsou vyvolány také řadou průmyslových chemikálií (např. černouhelný dehet a jeho deriváty, či krotonový olej), barviv (methylenová modř, bengálská červeň), dezinfekčních prostředků (triclosan, chlorhexidin) či surovin pro kosmetické prostředky, např. éterické oleje používané jako vonné přísady, či UV filtry (Neumann et al., 2000).

Fotoalergie je oproti fototoxicitě poměrně vzácná. Na rozdíl od přímé fototraumatizace kůže při fototoxických reakcích je fotoalergie obvykle výsledkem imunitní reakce IV. typu (pozdní buněčný typ) zprostředkované T-lymfocyty (Dubakiene a Kupriene,

2006). Vzniká jen u predisponovaných osob po předchozí fázi sensibilizace (nejméně 1-2 týdny). Prakticky každá fototoxická látka může zapříčinit také fotoalergickou reakci. Většina fotoalergických reakcí je zaznamenána po topických léčivech (např. antiseptících, lokálních antiflogisticích), vonných substancích (parfémy obsahující éterické oleje) či chemických slunečních filtrech (např. benzofenony). Klinický obraz zpravidla odpovídá ekzémovým projevům s papulovezikulózním výsevem, časté je neostré ohrazení vyrážky a její šíření i za hranice ozáření (Ditrichová, 2008).

Fotogenotoxicita a fotokarcinogenita některých látek souvisí se vznikem singletového kyslíku, volných radikálů a dalších reaktivních forem kyslíku. Pokud dojde k narušení DNA či jiných buněčných struktur, objeví se mutace a chromozomální aberace, které mohou vést ke vzniku nádorů (Loveday, 1996). Fotogenotoxický potenciál byl potvrzen u řady látek používaných ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu, jedná se např. o psoraleny, fenothiaziny, fluorchinolony a další substance (Stern, 1998). Značná pozornost je v poslední době věnována genotoxickému potenciálu 8-methoxypsoralenu, jenž je více jak 30 let využíván ve fotochemické terapii lupénky a jiných kožních chorob. V rámci tzv. PUVA terapie je ve formě tablet, koupelí či topicky podáván 8-methoxypsoralen a po 1-2 hodinách poté je léčená pokožka ozářena suberytematózními dávkami UVA. V posledních letech bylo prokázáno, že tato terapie může vést ke zvýšenému výskytu maligních melanomů a jiných typů kožních nádorů (Stern et al., 1997; Müller et al., 1998).

1.3.4. Fototoxická éterických olejů

Významnou skupinu fototoxických substancí tvoří látky rostlinného původu, vyvolávající tzv. fytofotodermatózy. Furokumariny neboli psoraleny jsou přírodní heterocyklické sloučeniny s kumarinovou strukturou navázanou na furanové jádro (Tisserand a Balacs, 1995). Vyskytují se především v rostlinách z čeledi Rutaceae (citrusy, ruta aj.), Umbelliferae (např. bolševník, andělíka, karotka, celer, petržel, pastiňák) a Moraceae (fíkovník, chlebovník). Tyto fotoaktivní látky zcitlivují kůži na slunce nejen po kontaktu, ale i po perorálním podání (Pathak, 1986). Po konzumaci celerového salátu a džusu s vysokým obsahem psoralenů a následné návštěvě solária byla popsána bulózní reakce na celém povrchu těla, vyžadující léčbu kortikoidy (Ljunggren, 1990). K závažné fototoxické reakci může dojít i vlivem ozáření kůže po potřísnění šťávou ze slupek citrusových plodů (Gross et al., 1987).

Furokumariny se vyskytují i v některých vonných substancích rostlinného původu, používaných v kosmetických a farmaceutických přípravcích. Jedná se především o éterické oleje, přírodní aromatické sekundární metabolity některých rostlin, získávané parní či vodní

destilací vyvinutou Araby již ve středověku. Jsou používány po staletí pro svou vůni a účinky - antimikrobiální, analgetické, protizánětlivé, sedativní aj. Teprve v dnešní době však dochází k odhalení jejich mechanismů účinku (Bakkali et al., 2008). Z hlediska potenciálu fotosenzibilizace jsou středem pozornosti citrusové éterické oleje (např. bergamotový, citronový, pomerančový), jež mohou na kůži vyvolat po ozáření sluncem kontaktní fototoxické reakce s následující přetrvávající hyperpigmentací či přesuny pigmentu (Ditrichová, 2008). Tento stav byl popsán poprvé již v roce 1916 a je znám jako *berloque dermatitis* neboli přívěsková dermatitida. Vyznačuje se lokalizovanými skvrnami na krku, obličeji či pažích, vznikajícími po aplikaci parfémů s obsahem bergamotového oleje a následné expozici slunečnímu záření (Zaynoun et al., 1981). Teprve v polovině 20. století byl tento jev objasněn, když byl potvrzen fotosenzibilizující potenciál furokumarinů, jmenovitě bergaptenu (5-methoxypsoralen) a xanthotoxinu (8-methoxypsoralen), látek s nejsilnějšími fototoxickými účinky (Kavli a Volden, 1984).

Furokumariny existují ve formě lineární (psoraleny, isopimpinelin, citropten, oxypeucedanin aj.) či angulární (např. angelicin, pimpinelin). Absorbují UV záření v rozsahu 300 – 335 nm. Po absorpci fotonu molekulou furokumarinu dojde k fotodynamické reakci typu II, tj. k tvorbě singletového kyslíku a následnému poškození buněčných membrán, jader, enzymů apod. (Joshi a Pathak, 1983, Morliere et al., 1980). Zároveň dojde k excitaci molekuly furokumarinu do tripletového stavu a kovalentní vazbě s DNA. Vytvářejí se monofunkční adukty mezi furanovou vazbou psoralenu a cytosinem či thymidinem. Lineární furokumariny způsobují překřížení vláken DNA (cross-linking). Vznik aduktů vede k mutacím, inhibici syntézy DNA a buněčné proliferace, stimuluje melanogenezi a způsobuje buněčnou smrt (Musajo a Rodighiero, 1972). V případě bergaptenu bylo potvrzeno, že má fotogenotoxické i fotokarcinogenní účinky, po opakované dermální aplikaci vyvolává u myší zvýšený výskyt karcinomů kůže (Averbeck et al., 1990; Young et al., 1990).

Bergamotový olej, lisovaný za studena ze slupek pomeranče *Citrus aurantium* ssp. *bergamia*, byl pro svoji příjemnou vůni používán do kosmetických prostředků či jako přísada čajů (Earl Grey) po staletí. Obsahuje více než 300 složek včetně řady furokumarinů, jako je bergapten (0,3 - 0,39%), bergamotin, citropten, bergaptol, isopimpinelin či oxypeucedanin (Leung a Foster, 2003). Chemoabsorpčními a extrakčními technikami lze z bergamotového oleje odstranit bergapten a ostatní furokumariny. Výsledný olej je znám pod názvem bergamot FCF ("furocoumarin-free"). Bergamotový olej je široce užívaná aromatická ingredience kosmetických prostředků, které se aplikují na pokožku exponovanou slunci, přestože některé jeho komponenty mohou způsobit fototoxickou reakci (Tisserand a Balacs,

1995). Bylo zjištěno, že ani přidání UV filtrů (0,5 – 1%) do parfémových kompozic obsahujících bergapten nezabrání vzniku fototoxické reakce na kůži (Dubertret et al., 1990). Mezinárodní asociace výrobců fragrancí (International Fragrance Association – IFRA) proto doporučuje maximální obsah bergamotové silice 0,4% ve výrobcích určených k aplikaci na kůži exponované slunci, aby se omezilo nebezpečí fototoxicity nebo fotokarcinogeneze (IFRA, 1992). V aromaterapeutických přípravcích není obsah bergaptenu nijak omezen, a proto se objevují případy závažného poškození kůže po použití sauny s aromaterapeutickou koupelí a následnou expozicí UV záření v soláriu (Kaddu et al., 2001).

Ostatní za studena lisované citrusové oleje, např. citronový (*Citrus limon*), grapefruitový (*Citrus paradisi*), pomerančový (*Citrus sinensis*) a mandarinkový (*Citrus reticulata*), jsou také známé fototoxikanty, které obsahují fotoaktivní furokumariny jako je bergapten a jeho deriváty, např. bergamotin, citropten, herniarin nebo oxypeucedanin (Naganuma et al., 1985). V roce 2005 Vědecký výbor pro spotřební výrobky vydal omezení pro furokumarinové substance používané v kosmetice s cílem omezit riziko vzniku fototoxických reakcí u spotřebitelů. Celková koncentrace těchto látek nesmí být vyšší než 1 ppm v konečném výrobku (SCCP, 2005).

Další potenciálně fotoaktivní látkou je citral, který je obsažen v menším množství v citrusových silicích a představuje hlavní složku éterického oleje z *Litsea cubeba*. Tento monoterpenický aldehyd, vyskytující se ve formě isomerů neral a geranial, vykazuje zvýšené toxické účinky za přítomnosti UVA záření na bakterie, plísně (Asthana et al., 1992) a houby (Green a Berenbaum, 1994). Olej *Litsea cubeba* navodil fototoxické účinky in vitro také v buněčné kultuře fibroblastů 3T3 (Kandárová, 2006). Po ozáření UV dochází k fotochemické přeměně citralu na cyklické formy fotocitral A a fotocitral B (Barany et al., 1978), ale údaje o případných fototoxických vlastnostech těchto produktů citralu nejsou v literatuře dostupné.

Nejnovější poznatky vedou k otázce, zda rozšíření konzumace citrusových plodů a džusů nemá spojitost se zvýšeným výskytem karcinomu kůže v posledních 50 letech (Sayre a Dowdy, 2008). Zatímco pro kosmetické prostředky bylo Vědeckým výborem pro spotřební výrobky při Evropské komisi vydáno omezení na obsah furokumarinů ve finálních výrobcích (SCCP, 2005), a řada extraktů z dalších rostlin s obsahem furokumarinů je v kosmetických prostředcích úplně zakázána, např. Pakmín větší (*Ammi majus*) a jeho galenické přípravky, či Fíkovník smokvoň (*Ficus carica*) a Aloisie trojlistá (*Lippia citriodora*), jež jsou zakázány jako složky parfémů (Příloha č.2 k vyhlášce č. 448/2009 Sb., o stanovení hygienických požadavků na kosmetické prostředky), nebyla dosud provedena žádná studie dietárního příjmu těchto látek v rámci EU.

1.3.5. Hodnocení fototoxických účinků

Bezpečné užívání chemických látek a přípravků, kosmetických prostředků i léčiv předpokládá toxikologické testy u surovin, případně i finálního výrobku, potvrzující nepřítomnost nebezpečných vlastností včetně fototoxicity. Hodnocení fototoxicity je nutné u všech látek, které absorbují světelnou energii v oblasti slunečního světla. Podle prvního zákona fotochemie (Grotthaus-Draperův zákon) vyžaduje fotoreakce dostatečnou absorpci světelných kvant. Před zahájením biologického zkoušení je potřeba stanovit UV/vis absorpční spektrum zkoušené látky podle metodického pokynu OECD (OECD, 1981).

Pro zkoušení potenciálu fototoxicity se až dosud využívaly klasické metodické postupy na zvířatech nebo ve skupině dobrovolníků (Kligman a Breit, 1968; Marzulli a Maibach, 2004), kdy navozená fototoxická reakce byla hodnocena na základě klinických symptomů. Testy in vivo na zvířatech se staly předmětem oprávněné kritiky nejen z důvodů etických, ale často i pro nízký stupeň spolehlivosti v predikci reakce u lidí. Žádná z dříve užívaných zkoušek akutní fototoxicity na morčatech, myších, králících či potkanech nebyla vědecky vyhodnocena či validována (Lovell a Sanders, 1992; Nilsson et al., 1993). V 90. letech minulého století proto Evropská komise reprezentovaná svým Generálním ředitelstvím IX (Directorate General XI) a později Evropským centrem pro validaci alternativních metod (ECVAM) společně s Asociací výrobců kosmetiky a toaletního zboží (COLIPA) zorganizovala rozsáhlou studii pro vývoj a validaci zkoušek fototoxicity in vitro. Jako nejperspektivnější se projevila zkouška fototoxicity využívající buněčné linie myších fibroblastů Balb/c 3T3, která byla posléze úspěšně validována (Spielmann et al., 1994, 1998). V roce 2000 se v členských státech EU stala tato zkouška jakožto první alternativní metoda in vitro součástí právního řádu (Směrnice 67/548/EEC, Metoda B.41, Příloha 5) a v roce 2004 byla přijata jako metodický pokyn OECD (Test Guideline 432, OECD, 2004a).

Zkouška vyhodnocuje fotocytotoxicitu z relativního snížení životaschopnosti buněk, myších fibroblastů linie Balb/c, exponovaných zkoušené látce v přítomnosti světla versus při jeho absenci. 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 nedifusně proniká buněčnými membránami a akumuluje se v lysosomech buněk. 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, 2008c; OECD, 2004a).

Vzhledem k vysoké citlivosti je tato zkouška považována za spolehlivou základní metodu pro identifikaci akutních fototoxických účinků u člověka a pokud výsledek u dané látky je negativní, není nutné další zkoušení. Tato metoda má však některé nevýhody a omezení, které jsou diskutovány v posledních letech řadou odborníků (Spielmann et al., 2000). Monolayer myších fibroblastů představuje velmi jednoduchý a zranitelný biologický systém ve srovnání s trojrozměrnou stavbou lidské kůže, která zahrnuje spojení a interakce různých typů buněk a především má ochrannou bariéru ve formě stratum corneum. Zkouškou 3T3 NRU PT nelze testovat směsi či látky ve vodě nerozpustné či látky s extrémní hodnotou pH. Citlivost buněk v monolayeru je navíc tak vysoká, že může vést k řadě falešně pozitivních výsledků, a to především ve vyšších koncentracích látek. Bylo zjištěno, že přestože je výsledek zkoušky 3T3 NRU PT pozitivní, zkoušená látka může být v některých případech aplikována bezpečně na kůži člověka, pokud není významně absorbována a nepenetruje do hlubších vrstev epidermis (Jones et al., 2003, Kandárová, 2006).

Jako doplňková metoda pro zkoušení látek aplikovaných na kůži byla proto navržena a podrobena prevalidačnímu procesu zkouška fototoxicity využívající modely rekonstruované lidské epidermis (Liebsch et al., 1999). Oproti zkoušce fototoxicity 3T3 NRU umožňuje tato metoda založená na trojrozměrných kožních modelech s funkční rohovou vrstvou odhadnout riziko 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, bez ředění, s extrémním pH či zapracované ve formulacích v nízkých koncentracích jako v konečném spotřebním výrobku (Liebsch et al., 2005).

Tato zkouška byla zařazena mezi validní alternativní metody do databáze ECVAM jako INVITTOX protokol č. 121 (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>).

2. Experimentální část

2.1. Cíle práce

Cílem této práce bylo sestavení a zavedení baterie alternativních metod in vitro využívajících buněčné, tkáňové a orgánové modely pro studium účinků záření a chemických faktorů na biologické systémy. Alternativní toxikologické metody in vitro bez použití zvířat zahrnovaly zkoušky využívající buněčnou kulturu fibroblastů 3T3 Balb/c a rekonstruované modely lidských tkání EpiDermTM a EpiOcularTM. Tyto zkoušky byly zavedeny a optimalizovány pro stanovení hazardu kožní a oční dráždivosti/leptavosti a fototoxicity u společensky závažných látek s možným zdravotním rizikem. Práce zahrnovala následující dílčí studie:

- V rámci mezinárodní pracovní skupiny byly z hlediska kožní dráždivosti zkoušeny chemické látky použité ve validační studii ECVAM, jež vedly k nejednoznačným výsledkům ve zkouškách na modelech rekonstruované lidské epidermis. Byla provedena optimalizace protokolu zkoušky dráždivosti modelu EpiDermTM a výsledky byly konfrontovány s existujícími daty z registru chemických látek a výsledky vlastních experimentálních studií kožní dráždivosti ve skupině dobrovolníků.
- V rámci grantového projektu IGA MZ ČR, zaměřeného na vyhodnocení místní snášenlivosti materiálů přicházejících do styku s lidským organismem prostřednictvím kůže, sliznic či očí, byla sestavena baterie zkoušek pro stanovení oční dráždivosti. Vybrané oftalmologické přípravky, chemické látky a finální kosmetické výrobky byly podrobeny zkoumání z hlediska jejich možné dráždivosti pro oko. Cílem této práce bylo rozšířit škálu zkoušených substancí, ověřit oblast použitelnosti alternativních metod, optimalizovat jejich protokol a přispět k procesu jejich validace.
- S použitím alternativních metod in vitro byl hodnocen potenciál fototoxicity u skupiny komerčně dostupných éterických olejů, které jsou součástí mnoha spotřebních výrobků. Na základě výsledků alternativních metod byla provedena limitovaná studie fototoxicity in vivo ve skupině lidských dobrovolníků, jejímž cílem bylo ověření možné extrapolace výsledků in vitro na situaci v humánní praxi.
- V rámci grantového projektu MPO, zaměřeného na vývoj nových fotoprotektivních ochranných prostředků, byly nově syntetizované UV absorbéry podrobeny škále toxikologických zkoušek. Jako první stupeň pro hodnocení bezpečnosti byly prováděny screeningové zkoušky fototoxicity a kožní dráždivosti in vitro.

2.2. Materiál a metodika

2.2.1. Buněčné a tkáňové kultury

2.2.1.1. Buněčná linie Balb/c 3T3

Jako substrát pro zkoušky fototoxicity (3T3 NRU PT), bazální cytotoxicity (NRU) a oční dráždivosti (NRR) byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů 3T3 Balb/c L1, dostupná v Evropské sbírce buněčných kultur (ECACC, <http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp>). Základní charakteristika a kultivační podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Při zkouškách fototoxicity byly použity pasáže nižší než 90 vzhledem k tomu, že ve vyšších pasážích vzrůstá citlivost buněk vůči záření (ES, 2008c). Citlivost buněk vůči záření UVA stanovena pomocí užívaného ozařovacího zařízení byla pravidelně 2x měsíčně ověřována. Zkouška splňovala kritéria jakosti, pokud životaschopnost buněk po ozáření dávkou 5 J/cm² byla více než 80% a po ozáření dávkou 9 J/cm² více než 50% životaschopnosti buněk uchovávaných v temnu.

Buněčná linie

Balb/c 3T3, klon L1

dodavatel: ECACC, č. 86052701

morfologie: adherentní fibroblasty

původ: myší embryo

Kultivační podmínky

Kultivační medium

Dulbeccova modifikace minimálního esenciálního media dle Eaglea (DMEM, LONZA)

100 IU/ml Penicilin (SIGMA)

100 µg/ml Streptomycin (SIGMA)

10% inaktivované bovinní sérum (S.M.L. výroba sér ZVOS Hustopeče, a.s)

Inkubační podmínky

Inkubátor HeraCell (HERAEUS)

teplota: 37°C

koncentrace CO₂: 7,5%

Pasážování

každé 3-4 dny

trypsinizace: 0,25% roztok trypsinu (SIGMA)

Prekultivace pro pokus

96-jamkové destičky pro tkáňové kultury s plochým dnem (TPP, Švýcarsko)

denzita: 1x10⁴ buněk /100 - 150 µl D-MEM na jamku

Doba inkubace: 22-24 hod (zkouška fototoxicity, cytotoxicity NRU)
70-72 hod (zkouška oční dráždivosti NRR)

Tab. 1: Základní charakteristika buněčné linie a kultivační podmínky

2.2.1.2. EpiDermTM - rekonstruovaný model lidské epidermis

Rekonstruovaný model lidské kůže EpiDermTM od firmy MatTek, USA, je trojrozměrný systém založený na kultivaci normálních lidských epidermálních keratinocytů, které tvoří mnohvrstevný, vysoce diferencovaný model lidské epidermis. Epidermální buňky jsou kultivovány na speciálních plastových stojáncích (insertách) za použití media bez séra, postupně se diferencují a tvoří mnohvrstevnou strukturu zahrnující bazální, spinózní, granulární a rohovou vrstvu (stratum corneum). Model EpiDermTM je mitoticky a metabolicky aktivní a obsahuje keratohyalin, desmozomy a intracelulární lamelární lipidové vrstvy ve stratum corneum, jež jsou typické pro epidermis in vivo. Strukturně je model velmi blízký lidské epidermis a proto představuje výborný substrát pro hodnocení kožní dráždivosti, leptavosti či fototoxicity in vitro (obr. 7).



Obr.7: Histologie modelu EpiDermTM
(zvětšení 400x, www.mattek.com)



Obr.8: Sada EpiDermTM

Základní sada EpiDermTM (EPI-200) dodávaná firmou MatTek v chladicím boxu obsahuje 24 tkání, které jsou uloženy v mikrotitrační destičce na vrstvě živného agaru a chlazeny dvěma balíčky ledu na teplotu 4-6°C (obr. 8). Sada obsahuje také speciální kultivační medium (DMEM) a součásti barvicí soupravy MTT (koncentrát MTT, rozpouštědlo MTT, pufr PBS pro oplach, extrační činidlo isopropanol a 24-jamkové plastové destičky). Základní charakteristika modelu EpiDermTM je uvedena v tabulce č. 2.

<u>Typ inserty</u>	Millicell PCF, průměr 9 mm, potažená kolagenem
<u>Buněčný typ</u>	Normální lidské epidermální keratinocyty
<u>Kultivační medium</u>	DMEM s přidáním antibiotik, růstových faktorů, insulinu, hydrokortizonu a stimulatorů buněčné diferenciace
<u>Původ</u>	Neonatální předkožka (jeden dárce)
<u>Kontrolováno výrobcem</u>	HIV, Hepatitis-B, Hepatitis-C, mykoplasma
<u>Kultivace</u>	34-37°C, 5% CO ₂ , přechod vzduch-voda
<u>Histologie</u>	8-12 buněčných vrstev (bazální, spinózní a granulární vrstvy) 10-15 vrstev (stratum corneum, rohová vrstva)

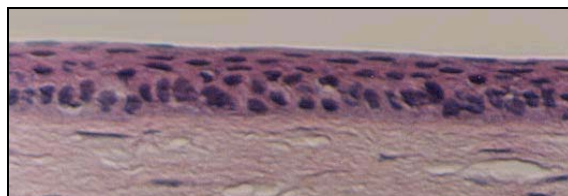
Tab. 2: Základní charakteristika rekonstruovaného modelu EpiDerm™ a kultivační podmínky (zdroj <http://www.mattek.com>)

2.2.1.3. EpiOcular™ - rekonstruovaný model lidské rohovky

Rekonstruovaný model lidské rohovky EpiOcular™ od firmy MatTek, USA, se skládá z normálních lidských epidermálních keratinocytů, které tvoří stratifikovaný dlaždicový epitel podobný epitelu rohovky. Epidermální buňky jsou kultivovány na speciálních plastových stojancích (insertách) za použití media bez séra, postupně se diferencují a tvoří mnohovrstevnou strukturu analogickou stavbě normálního korneálního epitelu in vivo (obr. 9 a 10, převzaty z www.mattek.com). Model EpiOcular je mitoticky a metabolicky aktivní a uvolňuje řadu cytokinů spojených s oční dráždivostí a zánětem (www.mattek.com).



Obr. 9: Histologie modelu EpiOcular™
(zvětšení 360x)



Obr. 10: Histologie králičí rohovky
(zvětšení 360x)

Základní sada EpiOcular™ (OCL-200) dodávaná firmou MatTek v chladicím boxu obsahuje 24 tkání, které jsou uloženy v mikrotitrační destičce na vrstvě živného agaru a chlazeny dvěma balíčky ledu na teplotu 4-6°C. Sada obsahuje také speciální medium (DMEM) a součásti barvicí soupravy MTT (koncentrát MTT, rozpouštědlo MTT, pufr PBS pro oplach, isopropanol a 24-jamkové plastové destičky). Základní charakteristika modelu EpiOcular™ je uvedena v tabulce č. 3.

<u>Typ inserty</u>	Millicell PCF, průměr 9 mm
<u>Buněčný typ</u>	Normální lidské epidermální keratinocyty
<u>Kultivační medium</u>	DMEM s přidáním antibiotik, růstových faktorů, insulinu, hydrokortizonu a stimulátorů buněčné diferenciace
<u>Původ</u>	Neonatální předkožka (jeden dárce)
<u>Kontrolováno výrobcem</u>	HIV, Hepatitis-B, Hepatitis-C, mykoplasma
<u>Kultivace</u>	34-37°C, 5% CO ₂ , přechod vzduch-voda
<u>Histologie</u>	5-8 buněčných vrstev (bazální vrstva k apikálnímu povrchu) bez kornifikace (rohovění)

Tab. 3: Základní charakteristika rekonstruovaného modelu EpiOcular™ a kultivační podmínky (zdroj www.mattek.com)

Výrobce kontroluje každou šarži dodávaných tkání EpiDerm™ a EpiOcular™. Bariérová funkce je ověřována standardem Triton X-100 (1%) ve zkoušce zahrnující několik časových bodů. Poté je vypočítána hodnota ET50 (doba nutná ke snížení životnosti tkání na 50% po aplikaci cytotoxické látky), která musí být v historicky daném rozmezí. V opačném případě výrobce informuje své zákazníky, že daná šarže tkání nesplňuje kriteria kvality, a dodá náhradní sadu tkání.

2.2.1.4. Barvení MTT

Vitální žluté barvivo MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid, CAS 298-93-1) je přijímáno buňkami a redukováno mitochondriální reakcí za vzniku modrého produktu formazanu, který se akumuluje v buňce, protože neprochází plasmatickou membránou. Při solubilizaci buněk vhodným fixačním roztokem (např. isopropanolem) dojde k uvolnění formazanu, jehož množství lze detekovat a kvantifikovat jednoduchou kolorimetrickou metodou s využitím spektrofotometru. Schopnost buněk redukovat MTT indikuje mitochondriální integritu a aktivitu, která může být interpretována jakožto míra životaschopnosti či počtu buněk. Schopnost buněk redukovat MTT po expozici zkoušené látky ve srovnání s negativní kontrolou, exponovanou standardní netoxické substancí, umožňuje hodnotit relativní toxicitu zkoušené látky (ES, 2009).

Barvení rekonstruovaných modelů tkání EpiDermTM a EpiOcularTM bylo provedeno dle protokolu INVITTOX č.17 (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>).

Barvicí souprava MTT (koncentrát MTT, rozpouštědlo MTT, pufr PBS pro oplach, extrační činidlo isopropanol a 24-jamkové plastové destičky) byla součástí každé dodávky tkání od firmy MatTek. Médium MTT bylo připraveno bezprostředně před použitím smícháním koncentráту a rozpouštědla MTT. Před zahájením barvení v závislosti na použitém protokolu byly tkáně EpiDermTM či EpiOcularTM opláchnuty PBS a umístěny do 24-jamkových destiček s 0,3 ml MTT media na jamku. Po 3h inkubaci (37°C, 5% CO₂) byly tkáně opláchnuty PBS a přeneseny do 24-jamkové destičky obsahující extrační činidlo (isopropanol, 2 ml na jamku). Extrakce probíhala 2 hod za mírného třepání na třepačce. Výsledná koncentrace formazanu, vzniklého enzymatickou redukcí MTT ve tkáních, byla stanovena měřením absorbance při vlnové délce 540 nm na spektrofotometru Varian UV-VIS CARY 1E.

2.2.2. Analytické metody

2.2.2.1. Fluorimetrie

Fluorimetrická metoda stanovení životnosti buněčné kultury je založena na inkorporaci vitálního fluorescenčního barviva (např. neutrální červen - NR) do živých buněk ("neutral red uptake"), které je při ukončení pokusu uvolněno z buněk působením fixačního roztoku, jenž rozruší membrány a tím umožní průnik intracelulárního obsahu do okolního media. Fluorescence výsledného roztoku je následně detekována v systému excitačního (530 nm) a emisního filtru (590 nm) při průchodu studeného světla. Životnost buněčné kultury je vyjadřována v % detekované fluorescence v kultuře s přítomností testované látky vůči kontrolní kultuře bez přítomnosti testované látky (Rat, 1993).

Pro detekci emitované fluorescence a měření fluorescenčních jednotek (FSU) byl použit multidetekční fluorescenčně-luminiscenční reader FLx800 (Biotek Instruments, USA).

2.2.2.2. Spektrofotometrie

Spektrální analýza vzorků éterických olejů byla provedena podle metodického pokynu OECD 101 (OECD, 1981). Vzorky byly ředěny v DMSO na koncentraci 0,1 mg/ml. Absorbance v oblasti UV/vis byla měřena v rozmezí 200-750 nm proti blanku (DMSO).

Kvantifikace formazanu, produktu mitochondriální redukce barviva MTT, užívaného jako indikátoru životnosti tkání EpiDermTM a EpiOcularTM, byla stanovena při vlnové délce 570 nm proti blanku (isopropanol).

Veškeré spektrofotometrické analýzy byly prováděny na spektrofotometru Varian Cary UV-VIS 1E (Varian, Inc., USA) s použitím jednorázových UV-mikrokyvet s obsahem 70 µl (BRAND GmbH, Německo).

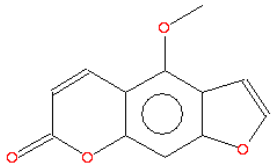
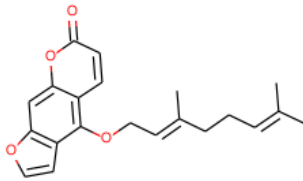
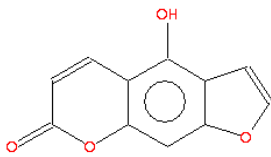
2.2.2.3. Chromatografie

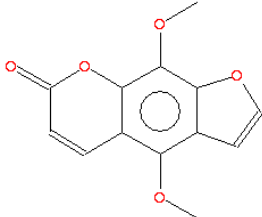
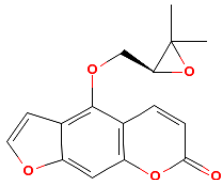
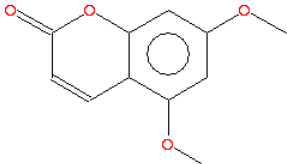
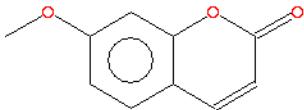
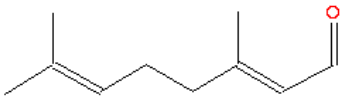
Složení éterických olejů bylo stanoveno pomocí tandemu plynového chromatografu Agilent 7890A a hmotnostního detektoru Agilent 5975C (GC/MS). Detaily chromatografické analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 4.

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

Tab. 4: 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). Přehled stanovovaných složek éterických olejů je uveden v tabulce č. 5.

Název/ synonyma	Název dle 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-{[(2 <i>E</i>)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl]oxy}-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]chromen-7-on	
Bergaptol 5-hydroxypsoralen 5-hydroxy-furokumarin	4-hydroxy-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]chromen-7-on	

Isopimpinelin 5,8-dimethoxy- psoralen 5,8-dimethoxy-6,7- furokumarin	4,9-dimethoxy-7 <i>H</i> -furo[3,2- g]chromen-7-on	
Oxypeucedanin 5-(isoamyloxy-2,3- epoxid)psoralen	4- {[<i>(2S)</i> -3,3-dimethyloxiran-2- yl]- methoxy}-7 <i>H</i> -furo[3,2- g]chromen-7-on	
Citropten 5,7-dimethoxy- kumarin Citrapten Limetin	5,7-dimethoxy-2 <i>H</i> -chromen-2- on	
Herniarin 7-methoxykumarin Methylumbelliferon	7-methoxy-2 <i>H</i> -chromen-2-on	
Citral cis,trans-citral geranial/neral	3,7-dimethylokta-2,6-dienal	

Tab. 5: Stanovované složky éterických olejů

2.2.3. Kožní dráždivost

2.2.3.1. Chemické látky

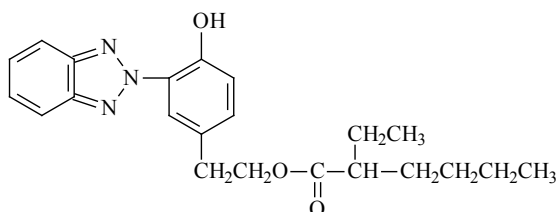
V rámci studie kožní dráždivosti chemických látek in vitro a in vivo byly testovány vybrané chemické látky, které byly zahrnuty do validační studie ECVAM (Spielmann et al., 2007), a chemické látky (č.3, 4, 8, 10, 13, 15, 17 a 21), které byly v minulosti zkoušeny in vivo v jiných studiích (Basketter et al., 2004). Tabulka č. 6 shrnuje jejich název, CAS číslo, čistotu a dodavatele.

č.	Název	číslo CAS	čistota (%)	Dodavatel
1	20% Natrium-dodecyl-sulfát (Laurylsíran sodný SLS)	151-21-3	>99	Merck
2	2-Isopropyl-2-isobutyl-1,3-dimethoxypropan	129228-21-3	>=95	ECVAM
3	Kyselina nonanová	112-05-0	96	Aldrich
4	Kyselina dekanová	334-48-5	96	Aldrich
5	Heptaldehyd (heptanal)	111-71-7	>=95	Fluka
6	Butyl-methakrylát	97-88-1	99	Sigma-Aldrich
7	di-n-Propyldisulfid	629-19-6	98	Aldrich
8	α -terpineol (2-(4-Methylcyklohex-3-enyl)-propan-2-ol))	98-55-5	95	Alfa Aesar
9	1-Bromhexan	111-25-1	>98	Fluka
10	Dekan-1-ol	112-30-1	99+	Sigma-Aldrich
11	Undec-10-enová kyselina	112-38-9	98	Sigma
12	bis[(1-Methylimidazol)-(2-ethylhexanoát)], Zn komplex	neurčeno	>=95	ECVAM
13	Hexyl-salicylát	6259-76-3	98+	SAFC
14	Terpinyl-acetát	80-26-2	95+	SAFC
15	Linalyl-acetát	115-95-7	>95	Fluka
16	Směs isomerů: 1-(2-isopropylfenyl)-1-fenylethan, 1-(3-isopropylfenyl)-1-fenylethan, 1-(4-isopropylfenyl)-1-fenylethan	52783-21-8	>=95	ECVAM
17	Heptyl-butyrát	5870-93-9	98+	SAFC
18	Směs isomerů: 1-(spiro[4.5]dec-7-en-7-yl)pent-4-en-1-on, 1-(spiro[4.5]dec-6-en-7-yl)pent-4-en-1-on	224031-70-3	>=95	ECVAM
19	4-Methylthio-benzaldehyd	3446-89-7	95	Aldrich
20	Hydroxycitronellal (3,7-dimethyl-7-hydroxyoktanal)	107-75-5	95+	Aldrich
21	Kyselina dodekanová	143-07-7	98+	SAFC
22	Dipropylenglykol	25265-71-8	99	Aldrich
23	Kyselina 1-naftalenooctová	86-87-3	97	Sigma
24	3,4-Dimethyl-1-H-pyrazol	2820-37-3	>=95	ECVAM
25	1-Brom-4-chlorbutan	6940-78-9	99	Aldrich

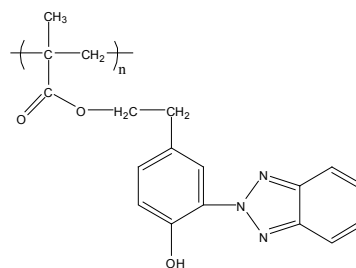
Tab. 6: Chemické látky zkoušené na kožní dráždivost

2.2.3.2. UV filtry

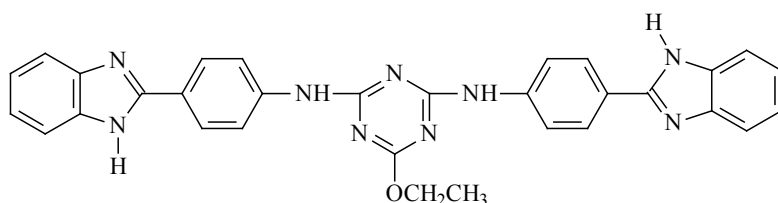
V rámci projektu MPO "Fotoprotektivní pracovní prostředky" byl zkoušen potenciál kožní dráždivosti nových UV filtrů, syntetizovaných ve VÚOS Rybitví, s označením Soltex E279, Soltex M a Cosol E.



Vzorec 1: Soltex E279



Vzorec 2: Cosol E



Vzorec 3: Soltex M

2.2.3.3. Zkouška kožní dráždivosti in vitro s využitím modelu EpiDerm™

Ve studii kožní dráždivosti 25 chemických látek provedené ve spolupráci s Dr. Basketterem (UNILEVER, Velká Británie), Centrem pro alternativní metody ZEBET (Německo) a firmou MatTek (USA) byl použit optimalizovaný postup s modifikovanou dobou aplikace vzorků 60 min dle protokolu firmy MatTek, verze 7.0 (MatTek, 2009).

Zkouška kožní dráždivosti UV filtrů byla prováděna dle SOP firmy Mattek, verze 5.0, pro klasifikaci chemických látek, použitého ve 2. fázi validační studie kožní dráždivosti ECVAM, s aplikací látek po dobu 15 min (ECVAM, 2004). Vzorek Cosol E byl zkoušen také v modifikovaném protokolu s prodlouženou dobou aplikace na 60 min.

Po příjmu zásilky od firmy MatTek byly tkáň EpiDerm™ vyjmuty z transportní agarové destičky, přeneseny do 6-jamkových destiček obsahujících předeřáté medium (0,9 ml) a inkubovány přes noc za účelem odstranění stresových látek vzniklých při transportu.

Chemické látky byly testovány na třech tkáních, jako negativní kontrola byla použita sterilní deionizovaná voda, jako pozitivní kontrola 5% vodný roztok laurylsíranu sodného SLS (SIGMA, ČR).

Po 16-24 hodinách preinkubace (37°C, 5% CO₂) byly na tkáň aplikovány kontroly nebo vzorky v množství 30 µl kapalného vzorku/tkáň nebo 25 mg pevného vzorku/tkáň a inkubovány 35 min v inkubátoru v 6-jamkových destičkách. Poté byly tkáň vyňaty z inkubátoru a po dosažení 15 minutové, resp. 60 minutové expozice byly postupně oplachovány ve sterilním PBS. Po ukončení aplikace byly tkáň 15x opláchnuty pomocí stříčky a na závěr třikrát ponořeny do 150 ml PBS, osušeny na buničině a přeneseny do 6-jamkových destiček naplněných čerstvým předeštěným médiem (0,9 ml/jamku). Poté byly tkáň inkubovány dalších 42 hodin. Po ukončení post-kultivace byly tkáň přeneseny do 24-jamkových destiček obsahujících medium s rozpuštěným barvivem MTT (0,3 ml/jamku) a inkubovány 3 hodiny. Po obarvení byly tkáň přeneseny do destičky s extrakčním činidlem (2 ml isopropanolu/jamku), roztřepány po dobu 2 hod a výsledné zabarvení supernatantu bylo měřeno na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm. Z naměřených výsledků optické denzity (OD) byla spočítána životnost tkání po aplikaci vzorků dle vzorce: životnost vzorku (%) = OD vzorku / OD negativní kontroly. Pokus splňoval kritéria kvality, pokud průměrná optická hustota OD₅₇₀ u negativních kontrol byla $\geq 1,0$ a $\leq 2,5$, průměrná hodnota životnosti pozitivní kontroly (5% SLS) byla $\leq 20\%$ a směrodatná odchylka tří replikátů tkání ovlivněných testovanou látkou byla $< 18\%$.

Predikční model stanovený firmou MatTek umožňuje klasifikovat zkoušené látky následujícím způsobem: Pokud je životnost tkání ovlivněných zkoušenou látkou $> 50\%$ životnosti tkání ovlivněných vodou (negativní kontroly), je látka považována za nedráždivou pro kůži (neklasifikována dle EU / GHS). Pokud je životnost tkání ovlivněných zkoušenou látkou $\leq 50\%$ životnosti negativní kontroly, je látka klasifikována jako dráždivá pro kůži (klasifikace EU - R38 nebo GHS - kategorie 2).

2.2.3.4. Epikutánní test kožní dráždivosti (4h Human Patch Test – 4HPT)

Epikutánní testy kožní dráždivosti u 25 chemických látek byly provedeny dle postupu popsaného Basketterem et al. (2004). Výběr pokusných osob a postup testování se řídil principy zakotvenými v Mezinárodní etické směrnici pro biomedicínský výzkum zahrnující lidské účastníky (CIOMS, 2002). Studie byla realizována se souhlasem Etické komise Státního zdravotního ústavu Praha. Výběr osob byl prováděn na principu úplné dobrovolnosti.

Všichni dobrovolníci byli seznámeni s průběhem studie, splnili podmínky pro zařazení do studie a za tímto účelem vyplnili speciální dotazník.

Studie zahrnovala jednorázový uzavřený kožní test (patch-test) na kůži vnější části nadloktí. Vzorky byly aplikovány v množství 0,2 ml (kapaliny) nebo 0,2 g (vodou zvlhčené pevné látky) pomocí okluzivní náplasti Hill Top Chamber s vnitřním bavlněným terčíkem o průměru 25 mm (Hill Top Companies, Cincinnati, Ohio, USA). Jako pozitivní kontrola byl použit 20% vodný roztok laurylsíranu sodného (SIGMA, ČR) a jako negativní kontrola destilovaná voda. Doba expozice stoupala od 15 a 30 min, až po dosažení 1, 2, 3 až 4 hodin. Pro hodnocení kožních reakcí bylo použito následující čtyřstupňové bodování:

- 0 žádná významná reakce,
- + slabý erytém, edém, suchost či šupinatění na převažující části místa aplikace,
- ++ zřetelný erytém případně přesahující místo aplikace, doprovázený edémem, šupinatěním, případně hemoragií či strupy,
- +++ silný erytém přesahující místo aplikace, doprovázený edémem, hemoragií či tvorbou krusty.

Projevy kožní dráždivosti byly odečítány 24, 48 a 72 hod po sejmutí náplasti. Pokud se u subjektu objevila kožní reakce ve formě slabého erytému nebo vyšší v kterémkoli čase odečtu, další aplikace nebyla provedena. Pokud nebyla zaznamenána žádná reakce, následovala další aplikace na nové nedotčené místo kůže s delší dobou expozice. Celkový počet subjektů, u nichž byla vyvolána pozitivní reakce na zkoušenou látku po době expozice až 4 hodiny, byl poté s využitím Fisherova exaktního testu (Siegel a Castellan, 1988) porovnán s počtem subjektů, u nichž byla vyvolána dráždivá reakce po aplikaci pozitivní kontroly SLS. Látka byla klasifikována jako dráždivá (R38), pokud incidence pozitivních reakcí na zkoušenou látku byla signifikantně vyšší nebo se významně nelišila od incidence pozitivních reakcí vyvolaných v téže skupině dobrovolníků 20% roztokem SLS.

2.2.4. Oční dráždivost

2.2.4.1. Oftalmologické přípravky

Jako referenční nedráždivé látky pro zkoušky oční dráždivosti (zkoušky cytotoxicity NRR a NRU) byly otestovány farmakologické přípravky dostupné bez lékařského předpisu: Ophthalmo-Septonex (IVAX), Oční voda s kyselinou boritou (Krčská lékárna), Garasone (Schering-Plough), Visine (Pfizer), Ophtal (IVAX), Sanorin-Analergin (IVAX), dále pitná voda odebraná z kohoutku a fyziologický roztok (přípravna půd SZÚ).

2.2.4.2. Chemické látky

Pro zkoušky oční dráždivosti in vitro bylo vybráno 20 látek použitých ve studii kožní dráždivosti in vitro a in vivo (viz kapitola 2.3.1.1.). Názvy chemických látek a jejich charakterizace jsou uvedeny v tabulce č. 7.

	Název	CAS	Čistota	Výrobce
1	20% Natrium-dodecyl-sulfát (Laurylsíran sodný SLS)	151-21-3	>99	SIGMA
2	Kyselina nonanová	112-05-0	96	Aldrich
3	Kyselina dekanová	334-48-5	96	Aldrich
4	Heptaldehyd (heptanal)	111-71-7	>95	Fluka
5	Butyl-methakrylát	97-88-1	99	Sigma-Aldrich
6	di-n-Propyl disulfid	629-19-6	98	Aldrich
7	α -terpineol (2-(4-Methylcyklohex-3-enyl)-propan-2-ol)	98-55-5	95	Alfa Aesar
8	1-Bromhexan	111-25-1	>98	Fluka
9	Dekan-1-ol	112-30-1	99+	Sigma-Aldrich
10	Undec-10-enová kyselina	112-38-9	98	Sigma
11	Hexyl-salicylát	6259-76-3	98+	SAFC
12	Terpinyl-acetát	80-26-2	95+	SAFC
13	Linalyl-acetát	115-95-7	>95	Fluka
14	Heptyl-butyrát	5870-93-9	98+	SAFC
15	4-Methylthio-benzaldehyd	3446-89-7	95	Aldrich
16	Hydroxycitronellal (3,7-dimethyl-7-hydroxyoktanal)	107-75-5	95+	Aldrich
17	Kyselina dodekanová	143-07-7	98+	SAFC
18	Dipropylenglykol	25265-71-8	99	Aldrich
19	Kyselina 1-naftalenoctová	86-87-3	97	Sigma
20	1-Brom-4-chlorbutan	6940-78-9	99	Aldrich

Tab. 7: Chemické látky zkoušené na oční dráždivost

2.2.4.3. Kosmetické prostředky

Pro zkoušky oční dráždivosti směsných vzorků byly vybrány komerčně dostupné tenzidové kosmetické prostředky, uvedené v tabulce č.8.

Číslo	Název (charakterizace)	Výrobce
1	Johnson´s baby shampoo s kondicionerem (Dětský šampon)	Johnson and Johnson, Itálie
2	Head & Shoulders šampon proti lupům pro mastné vlasy (Šampon proti lupům s pyrithionem zinečnatým na mastné vlasy)	Procter and Gamble, Velká Británie
3	Hydratační pěnová sprchová kúra Sheer Vitality (Sprchový gel s pantenolem)	Eurona, ČR
4	Obnovující ochranný šampon Complete Regenergy (Šampon pro běžné použití)	Eurona, ČR
5	Tekuté mýdlo z obnovitelných zdrojů surovin (Ekologické tekuté mýdlo)	Everstar, ČR
6	Shampoo anti-dandruff cactus & pistachio (Šampon proti lupům s piroctonem olaminu)	Body Basics CZ, ČR
7	Shower gel White Tea (Sprchový šampon pro běžné použití)	Body Basics CZ, ČR
8	Tekuté mýdlo Dětský svět (Dětské tekuté mýdlo)	Eurona, ČR
9	Jericho Bath & Shower Gel Sugarcone (Sprchový gel s minerálními solemi)	Paloma Dead Sea Ltd., Izrael

Tab. 8: Kosmetické prostředky zkoušené na oční dráždivost

2.2.4.4. Zkouška oční dráždivosti NEUTRAL RED RELEASE (NRR)

Pro zkoušky oční dráždivosti oftalmologických přípravků, chemických látek i kosmetických prostředků metodou NRR (dle protokolu INVITTOX č.54) byly jako substrát použity myší fibroblasty 3T3 Balb/c, nasazené do 96-jamkových destiček v denzitě 1×10^4 /ml, v množství 150 μ l na jamku, a inkubovány 3-4 dny do dosažení konfluence. Po mikroskopickém ověření 100% konfluence bylo z jamek odsáto kultivační medium se sérem a jamky byly naplněny 100 μ l media se sérem a neutrální červení (NR) v koncentraci 50 μ g/ml media se sérem. Po 3 hodinách inkubace zajišťující dostatečnou inkorporaci NR do buněk bylo medium odsáto, jamky opláchnuty 200 ml fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS) a exponovány testovaným vzorkům v objemu 50 μ l (3 jamky na každou koncentraci). Zkoušené látky byly ředěny v PBS v rozmezí 1 - 1000 mg/ml a vždy byla použita i 100% neředěná látka. Jako negativní kontrola bylo použito PBS. Aplikace probíhala 1 minutu, poté byla látka jemně odsáta a každá jamka opatrně opláchnuta 200 μ l PBS (u nejvyšších koncentrací tenzidových kosmetických přípravků byl oplach proveden dvakrát). Následovalo mikroskopické vyšetření buněk v každé jamce pro vyloučení falešně negativních/pozitivních výsledků (mikroskop Olympus IX-50-S8F) a fotograficky

zdokumentovány výsledky (Digital Camera Olympus C-5050 ZOOM). Závěrem byla každá jamka naplněna 100 μ l fixačního roztoku (1 ml kyseliny octové v 49 ml deionizované vody a 50 ml ethanolu) a destička třepána 10 min na třepačce. Výsledné zabarvení NR odpovídající stupni poškození membrán buněčné kultury bylo měřeno fluorimetrickou metodou s využitím readeru Biotek a vyjádřeno pomocí fluorescenčních jednotek (Fluorescence Standard Units - FSU). Životnost kultury (%) byla stanovena výpočtem: průměr FSU vzorku/ průměr FSU negativní kontroly.

Z naměřených hodnot byla poté pomocí softwaru Phototox Version 2.0 (ZEBET, Německo) určena hodnota NRR_{50} , t.j. koncentrace testované látky v mg/ml, která způsobila uvolnění 50% NR z buněčné kultury oproti kontrolní kultuře, ovlivněné PBS. Vzhledem k tomu, že dosud neexistuje validovaný predikční model pro klasifikaci oční dráždivosti touto metodou, byly hodnoty NRR_{50} vztahovány k hodnotě NRR_{50} souběžně zkoušeného 20% SLS, o němž je známo, že má leptavé účinky na oči, značení R41 (ECETOC, 1998). Zkoušené látky, jež dosahují hodnoty NRR_{50} nad 1000 mg/ml, byly hodnoceny jako nedráždivé pro oči na základě výsledků studie Komise evropských společenství z roku 1991 (Anon., 1991).

Pro účely této studie byla zvolena následující klasifikace oční dráždivosti:

Klasifikace		NRR_{50} (mg/ml)	poznámka
NC	nedráždí	≥ 1000	nutno mikroskopicky ověřit
R36	dráždí	< 1000 a $> NRR_{50}(\text{SLS } 20\%)$	nutno potvrdit jinou alternativní zkouškou
R41	silně dráždí / leptá	$\leq NRR_{50}(\text{SLS } 20\%)$	

2.2.4.5. Zkouška oční dráždivosti NEUTRAL RED UPTAKE (NRU)

Pro zkoušky oční iritace oftalmologických přípravků a kosmetických prostředků metodou NRU (dle protokolu INVITTOX č. 46) byly jako substrát použity myší fibroblasty 3T3 Balb/c, nasazené do 96-jamkových destiček v denzitě 1×10^4 /ml, v množství 100 μ l na jamku, a inkubovány 18-24 hod do dosažení cca 60% konfluence. Po mikroskopickém ověření kvality buněk bylo z jamek odsáto kultivační medium se sérem a jamky byly naplněny 200 μ l zkoušených vzorků naředěných v mediu bez séra (4 jamky na každou

koncentraci). Jako negativní kontrola bylo použito medium bez séra, jako pozitivní kontrola 20% laurylsíran sodný (SLS).

Po 24 hod inkubaci byly testované vzorky odstraněny, jamky propláchnuty 200 μ l PBS a naplněny 200 μ l media s neutrální červení (NR) v koncentraci 50 μ g/ml. Následovalo mikroskopické vyšetření buněk v každé jamce pro vyloučení falešně negativních/pozitivních výsledků (mikroskop Olympus IX-50-S8F). Po 3 hodinách inkubace zajišťující dostatečnou inkorporaci NR do buněk bylo medium odsáto, jamky opláchnuty 200 ml PBS a naplněny 200 μ l fixačního roztoku (1 ml kyseliny octové v 49 ml deionizované vody a 50 ml ethanolu). Poté byla destička třepána 10 min na třepáče. Výsledné zabarvení NR odpovídající životnosti buněčné kultury bylo měřeno fluorimetrickou metodou s využitím multifunkčního readeru Biotek a vyjádřeno pomocí fluorescenčních jednotek (Fluorescence Standard Units - FSU). Životnost kultury (%) byla stanovena výpočtem : průměr FSU vzorku/ průměr FSU negativní kontroly.

Z naměřených hodnot byla poté pomocí softwaru Phototox Version 2.0 (ZEBET, Německo) určena hodnota NRU_{50} , t.j. koncentrace testované látky v μ g/ml, která způsobila 50% snížení životnosti buněčné kultury oproti kontrolní kultuře, ovlivněné mediem se sérem. Vzhledem k tomu, že dosud neexistuje validovaný predikční model pro klasifikaci oční iritace touto metodou, byly hodnoty NRU_{50} vztahovány k hodnotě NRU_{50} souběžně zkoušeného SLS, o němž je známo, že má leptavé účinky na oči, značení R41 (ECETOC, 1998). Zkoušené látky, jež dosahují hodnoty NRU_{50} nad 10 000 μ g/ml, jsou považovány za zcela necytotoxické a bez jakýchkoli negativních účinků na oči (Jones et al., 1999; Spielmann et al., 1996).

Pro účely této studie byla zvolena následující klasifikace oční dráždivosti:

Klasifikace		NRU_{50} (μ g/ml)	poznámka
NC	nedráždí	$\geq 10\,000$	nutno mikroskopicky ověřit
R36	dráždí	$< 10\,000$ a $>NRU_{50}$ (SLS 20%)	nutno potvrdit jinou alternativní zkouškou
R41	silně dráždí/ leptá	$\leq NRU_{50}$ (SLS 20%)	

2.2.4.6. Zkouška oční dráždivosti s využitím modelu EpiOcular™

Zkouška oční dráždivosti chemických látek byla prováděna dle SOP firmy MatTek pro klasifikaci chemických látek (Protokol "REACH", Mattek, 2007). Zkouška oční dráždivosti kosmetických prostředků byla provedena dle SOP firmy MatTek pro zkoušení rozpustných tenzidových přípravků (Protokol "Dilution Method", MatTek, 2005).

2.2.4.6.1. Postup zkoušky dle SOP pro chemické látky ("REACH")

Po příjmu zásilky od firmy MatTek byly tkáně EpiOcular™ vyjmuty z transportní agarové destičky, přeneseny do 6-jamkových destiček obsahujících předeřáté medium (0,9 ml) a inkubovány přes noc za účelem odstranění stresových látek vzniklých při transportu.

Chemické látky byly testovány na dvou tkáních, jako negativní kontrola byla použita sterilní deionizovaná voda, jako pozitivní kontrola methyl acetát (SIGMA, ČR).

Po 16-24 hodinách preinkubace byly tkáně zvlhčeny 20 μ l PBS a inkubovány dalších 30 min. Poté byly aplikovány kontroly nebo kapalně vzorky v množství 50 μ l/tkáň a inkubovány 30 min. Pevné látky byly aplikovány pomocí zarovnané lžičky (cca 50 mg) a inkubovány 90 min. Po určené době aplikace byly tkáně opláchnuty postupně ve 3 kádinkách se 100 ml PBS, osušeny na buničině a přeneseny do 12-jamkových destiček naplněných čerstvým médiem (5 ml/jamku). Po 12 minutovém ponoření (tzv. fáze "post-soak") byly tkáně vyjmuty, osušeny na buničině a inkubovány v 6-jamkových destičkách s médiem (0,9 ml/jamku) po dobu 120 min v případě kapalných vzorků, resp. po dobu 18 hodin v případě pevných vzorků (tzv. fáze "post-treatment").

Po ukončení této fáze byly tkáně přeneseny do 24-jamkových destiček obsahujících medium s rozpuštěným barvivem MTT (0,3 ml/jamku) a inkubovány 3 hodiny. Po obarvení byly tkáně přeneseny do 24-jamkové destičky s extrakčním činidlem (isopropanol, 2 ml/jamku), roztřepány po dobu 2 hod a výsledné zabarvení supernatantu bylo měřeno na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm. Z naměřených výsledků optické denzity (OD) byla spočítána životnost tkání po aplikaci vzorků dle vzorce: životnost vzorku (%) = OD vzorku / OD negativní kontroly. Predikční model stanovený firmou MatTek umožňuje klasifikovat zkoušené látky následujícím způsobem: Pokud je životnost tkání ovlivněných zkoušenou látkou >60% životnosti tkání ovlivněných vodou (negativní kontrola), je látka považována za nedráždivou pro oči. Pokud je životnost tkání ovlivněných zkoušenou látkou $\leq$ 60% životnosti negativní kontroly, je látka klasifikována jako dráždivá.

2.2.4.6.2. Postup zkoušky dle SOP pro rozpustné materiály ("Dilution Method")

Po příjmu zásilky od firmy MatTek byly tkáně EpiOcularTM vyjmuty z transportní agarové destičky, přeneseny do 6-jamkových destiček obsahujících předeřáté medium (0,9 ml) a inkubovány přes noc za účelem odstranění stresových látek vzniklých při transportu.

Zkoušené rozpustné látky byly testovány na dvou tkáních, jako negativní kontrola byla použita sterilní deionizovaná voda, jako pozitivní kontrola 0,3% Triton (tenzid dodávaný firmou MatTek). Všechny látky byly rozpuštěny ve sterilní vodě na koncentraci 20%.

Po 16-24 hodinách preinkubace byly na tkáně aplikovány zkoušené vzorky v množství 100 µl/tkáň. V předběžné zkoušce (tzv. "range finder"), byla doba aplikace všech látek shodná, a to 16 min. Negativní kontrola (voda) byla aplikována na 60 min, pozitivní kontrola (Triton) byla aplikována na 15 a 45 min. Po aplikaci vzorků a kontrol byly tkáně opláchnuty ve třech kádinkách se 100 ml PBS, osušeny na buničině a přeneseny do 12-jamkových destiček naplněných čerstvým mediem (5 ml/jamku). Po 10 minutovém ponoření (tzv. fáze "post-soak") byly tkáně vyjmuty, osušeny na buničině a inkubovány v 24-jamkových destičkách s mediem obsahujícím barvivo MTT (0,3 ml/jamku) po dobu 3 hodin. Po obarvení byly tkáně přeneseny do 24-jamkové destičky s extrakčním činidlem (isopropanol, 2 ml/jamku), roztřepány po dobu 2 hod a výsledné zabarvení supernatantu bylo měřeno na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm. Z naměřených výsledků optické denzity (OD) byla spočítána životnost tkání po aplikaci vzorků dle vzorce: životnost vzorku (%) = OD vzorku / OD negativní kontroly.

Na základě výsledků předběžného testu byl poté proveden na další sadě tkání vlastní test stejným postupem, ale s dobou aplikace dle následujícího schématu:

<u>životnost po 16 min. expozici</u>	<u>další časové body (doba aplikace)</u>
> 90%	64 min., 256 min.
< 90% ale > 30%	4 min., 64 min.
< 30%	1 min., 4 min.

Jednotlivé hodnoty životnosti tkání po expozici danému vzorku ve všech třech časových bodech byly na závěr dosazeny do tabulky EXCEL (dodána firmou MatTek) a vypočtena hodnota ET50 (čas, po který je nutno exponovat tkáně testované látky, aby došlo k poklesu životnosti o 50% oproti kontrole).

Dle predikčního modelu vytvořeného firmou MatTek na základě zkoušení řady substancí lze na základě hodnot ET50 klasifikovat látky následujícím způsobem:

Klasifikace oční dráždivosti		ET50 (min.)
NC	nedráždí	>256-26.5
R36-II	slabě dráždí	<26.5-11.7
R36-I	středně dráždí	<11.7-3.45
R41	silně dráždí/leptá	<3.45

2.2.4.7. Zkouška oční dráždivosti s využitím chorioalantoidní membrány slepičího embrya (HET-CAM)

Pro získání komplexního obrazu o účincích chemických látek a tenzidových kosmetických prostředků na tkáň oka byly do studie zahrnuty výsledky zkoušky HET-CAM (Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test) provedené v rámci SZÚ v laboratoři Oddělení toxikologie in vitro RNDr. Stanislavem Janouškem.

HET-CAM je alternativním testem pro zkoušení kožní a oční iritace a dráždění sliznic. Podstatou zkoušky je pozorování změn po aplikaci zkoušené látky na bohatě prokrvenou chorioalantoidní membránu fertilizovaného slepičího vejce (stáří 8 – 10 dní, 5 vajec pro každou látku). Po dobu 5 min po aplikaci se zaznamenává čas prvního výskytu hemoragie (H), koagulace (C) nebo lýzy (L). Po dosažení zaznamenaných časů v sekundách se vypočítá tzv. iritační skóre (IS) dle Kalweitova vzorce

$$IS = (301 - H) \times 5/300 + (301 - (L / V)) \times 7/300 + (301 - C) \times 9/300$$

Predikční model stanoví následující klasifikaci chemických látek metodou HET-CAM:

Klasifikace oční dráždivosti		IS
NC	nedráždí	0.0 - 0.9
R36-II	slabě dráždí	1.0 - 4.9
R36-I	středně dráždí	5.0 - 8.9
R41	silně dráždí/leptá	9.0 - 21.0

Zkouška byla prováděna dle protokolu INVITTOX č.47 (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>).

2.2.5 Biologické účinky záření - fototoxicita

2.2.5.1. Bergamotové a jiné éterické oleje

Ve studii fototoxicity byly použity komerčně dostupné éterické oleje bergamot (CAS 8007-75-8), Litsea cubeba (CAS 68855-99-2), pomeranč (CAS 8008-57-9), grapefruit (CAS 8016-20-4), citron (CAS 8008-56-0-8) a mandarinka (CAS 8008-31-9). Ve výsledcích a diskusi jsou vzorky označeny dle názvů výrobců: Aroma (Praha), Biomedica (Praha), SIGMA AG (Německo), Schupp GmbH (Freudenstadt, Německo), Nobilis Tilia (Krásná Lípa), Eoné (Krásná Lípa), Ivan Piša (Žebrák), Cosmetic Karl Hadek International (Ústí nad Labem) a SALUS (Míča a Harašta, Břeclav).

Glycerinová mýdla s obsahem silic od firmy SALUS byla vyrobena firmou Kateřina Honcová, Raškovice. K základnímu složení společnému pro všechna mýdla (dle Soupisu a společné nomenklatury přísad používaných v kosmetických prostředcích - INCI): "Aqua, Glycerin, Sodium Stearate, Propylene Glycol, Sorbitol, Sodium Laurate, Sodium Laureth Sulfate, Sodium Lauryl Sulfate, Sodium Chloride, Steric Acid, Lauric Acid, Pentasodium Pentetate, Tetrasodium Etidronate, barvivo" byly přidány éterické oleje v následujícím množství:

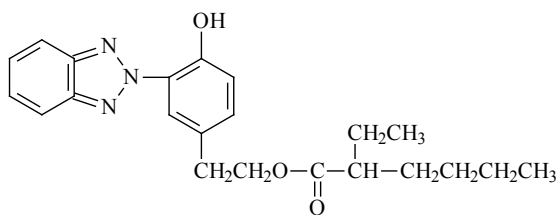
- *Glycerinové mýdlo s vůní "vánoční pohoda"*: červený pomeranč Citrus sinensis 0.044%,
Litsea cubeba 0.03%;
- *Glycerinové mýdlo s grapefruitem*: grapefruit Citrus paradisi 0.31%;
- *Glycerinové mýdlo s Litseou cubebou*: Litsea cubeba 0.18%;
- *Glycerinové mýdlo s červeným pomerančem*: červený pomeranč Citrus sinensis 0.26%.

2.2.5.2. UV filtry

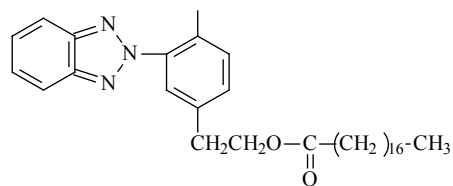
V rámci výzkumného projektu "Fotoprotektivní pracovní prostředky" FT- TA3/050 byly ve Výzkumném ústavu organických syntéz, Rybitví, připraveny tři typy nových UV filtrů podrobených následně biologickým zkouškám:

1) Lipofilní fotostabilní UV filtry rozpustné v oleji

Ester E-alkoholu s 2-ethylhexanovou kyselinou, označen jako Soltex E279 (vzorec 4), a jeho modifikace s názvem Soltex E311 (vzorec 5).



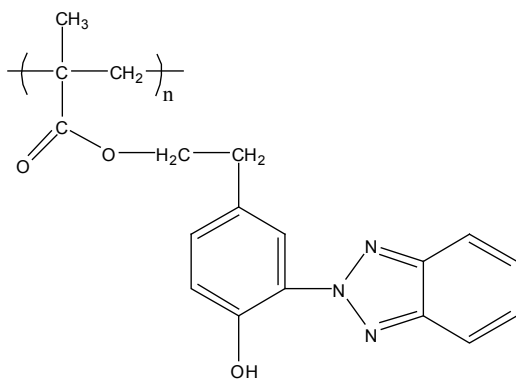
Vzorec 4: Soltex E279



Vzorec 5: Soltex E311

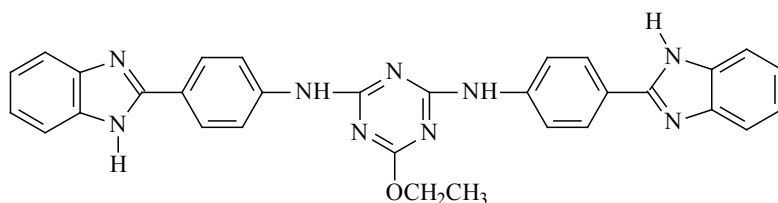
2) Organické ve vodě nerozpustné filtry

Kopolymer E-ester – kyselina methakrylová – butandioldimethakrylát v poměru 98:1,5:0,5 pod názvem Cosol E (vzorec 6). S přidavkem dispergátoru Spolapon AES byl namlet na částice o velikosti cca 200 nm a 80 nm.



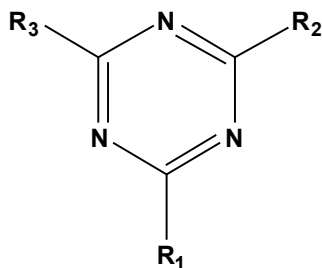
Vzorec 6: Cosol E

Kondenzací benzimidazolanilinu a kyanurchloridu byl připraven UV filtr pod názvem Soltex M (vzorec 7) a namlet s přidavkem dispergátoru Spolapon AES na průměr 85 nm.



Vzorec 7: Soltex M

Základní struktura UV absorbéru Soltex M uvedená ve vzorci 8 byla dále modifikována tak, jak to je naznačeno v tabulce č. 9.

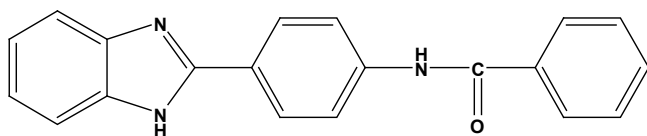


Vzorec 8: Obecná struktura UV absorbéru řady Soltex M

Soltex	R ₁	R ₂	R ₃
M	-OCH ₂ CH ₃		
MN			
2M	-OH		
3M	-OH	-OH	
4M	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	
5M	-O(CH ₂) ₃ CH ₃	-O(CH ₂) ₃ CH ₃	
6M	$\text{---O---CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{---}(\text{CH}_2\text{---})_3\text{CH}_3$	$\text{---O---CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{---}(\text{CH}_2\text{---})_3\text{CH}_3$	
7M	$\text{---O---CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{---}(\text{CH}_2\text{---})_3\text{CH}_3$		

Tab. 9: Modifikace struktury Soltexu M

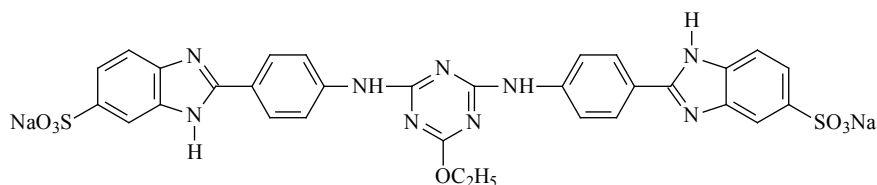
Kondenzací benzimidazolanilinu s benzoylchloridem byla vytvořena další varianta tohoto UV filtru pod názvem Soltex 8M (vzorec 9).



Vzorec 9: Soltex 8M

3) UV filtr rozpustný ve vodě

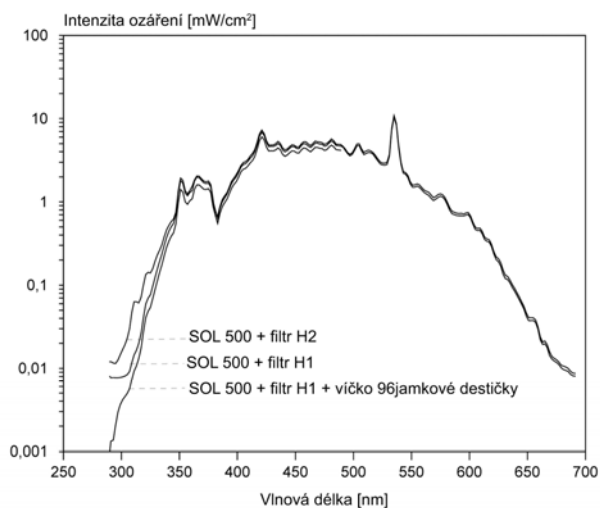
Vodouropustná varianta Soltexu M, obsahující sulfo skupiny, byla označena Soltex S (vzorec 10).



Vzorec 10: Soltex S

2.2.5.3. Světelný zdroj

Pro studie fototoxicity in vitro a in vivo byl použit solární simulátor od firmy Dr. Hönle (Planegg, Německo), který byl použit při validační studii zkoušky fototoxicity 3T3 NRU PT (Spielmann et al., 1998). UV-Sun Simulator, typ SOL-500, byl doplněn filtrem typu H1 s účelem odfiltrovat převážnou část záření UVB, které je pro buňky škodlivé. Spektrální charakteristika ozáření s použitím filtru a víčka plastové destičky pro tkáňové kultury je uvedeno na obrázku č. 11.



Obr. 11: Spektrální charakteristika ozáření simulátorem SOL-500 (převzato z ES, 2008c)

Solární simulátor byl upevněn na stojanu umožňujícím posun zářiče pro přesné nastavení expoziční vzdálenosti. Po 15 min předeřtí zářiče byla skrz víčko destičky změřena intenzita UVA záření a expoziční vzdálenost (cca 60 cm) byla nastavena tak, aby intenzita UVA dosahovala $1,7 \pm 0,1 \text{ mW/cm}^2$. Před každým pokusem byla intenzita záření kontrolována pomocí UVA radiometru, typ No.37 (Dr. Hönle, Planegg, Německo).

2.2.5.4. Zkouška fototoxicity 3T3 NRU PT

Zkouška fototoxicity éterických olejů a UV filtrů 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.41. Zkouška fototoxicity 3T3 NRU in vitro). Zkouška vyhodnocuje fotocytotoxicitu z relativního snížení životaschopnosti buněk exponovaných zkoušené látce v přítomnosti světla versus při jeho absenci. Cytotoxicita je vyjádřena jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva (neutrální červeně, NR) 24 hodin po působení zkoušené látky a ozáření.

Pro každou zkoušenou látku byly použity dvě identické destičky s plochým dnem pro tkáňové kultury 8x12 jamek (TPP, Švýcarsko). Jako buněčný substrát sloužila buněčná linie 3T3, prekulturnovaná v hustotě 1×10^4 buněk/jamku po dobu cca 20 hod před pokusem (37°C , 5% CO_2). Testovaná látka byla těsně před použitím rozpuštěna buď přímo v aplikačním mediu (ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem - PBS), nebo v etanolu či DMSO a následně v aplikačním mediu (PBS) tak, aby koncentrace etanolu/DMSO v PBS byla nanejvýš 1%. Po preinkubaci bylo z jamek odsáto kultivační medium se sérem a jamky byly naplněny 100 μl naředěného vzorku v 8 koncentracích (6 jamek na každou koncentraci). Jako kontrola bylo použito PBS. Buňky s testovanou látkou byly inkubovány v temnu po dobu 60 min, poté byla jedna destička (+UV) skrz víčko ozářena dávkou UVA 5 J/cm^2 , duplicitní destička (-UV) byla po dobu 50 min uchována za laboratorní teploty v temnu. Následně byly roztoky odstraněny, jamky promyty 150 μl PBS, naplněny kultivačním mediem se sérem a přes noc inkubovány. Následující den bylo kultivační medium z buněk odstraněno a nahrazeno 100 μl roztoku neutrální červeně (NR v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ DMEM bez séra). Po 3 hod inkubaci, promytí PBS a extrakci (extrakční činidlo: 1 ml kyseliny octové v 49 ml vody a 50 ml etanolu) byla stanovena životnost kultur kvantitativně (fluorimetricky). Stupeň cytotoxicity byl vyjadřován v % detekované fluorescence v kultuře s přítomností testované látky vůči kontrolní kultuře bez přítomnosti testované látky.

Pro predikci potenciálu fototoxicity bylo nezbytné analyzovat křivky koncentrace-odezva jak za přítomnosti (+UV), tak za nepřítomnosti (-UV) světla. Existují dvě verze predikčních modelů, jedna založená na porovnání koncentrací testované látky vedoucích k 50% inhibici příjmu NR (IC_{50}) a výpočtu fotoiritačního faktoru (PIF) a druhá založená na porovnání dvou křivek koncentrace-odezva (MPE).

Predikční model, verze 1: fotoiritační faktor (PIF)

Pokud byly získány úplné křivky koncentrace-odezva jak za přítomnosti (+UV), tak za nepřítomnosti (-UV) světla, fotoiritační faktor byl vypočítán podle vzorce

$$PIF = \frac{IC_{50}(-UV)}{IC_{50}(+UV)}$$

Pokud nelze vypočíst IC_{50} bez přítomnosti záření (látko není cytotoxická do maximální testované koncentrace), ale existuje IC_{50} v přítomnosti záření, nelze PIF stanovit, přestože výsledek naznačuje fototoxický potenciál zkoušené látky. V těchto případech byl z dosažených hodnot spočítán ">PIF", kdy za $IC_{50}(-UV)$ byla dosazena nejvyšší zkoušená koncentrace látky.

Pokud nelze vypočíst IC_{50} ani v přítomnosti ani absenci ozáření, nelze pro zkoušený materiál fotoiritační faktor PIF stanovit.

Predikční model, verze 2: střední světelný účinek (MPE)

V tomto modelu jsou překonána omezení modelu PIF v těch případech, kde nelze získat hodnotu IC_{50} . Střední světelný účinek (MPE) je založen na srovnání úplné křivky závislosti odezvy na koncentraci (Holzhütter, 1997).

Analýza dat

K predikci potenciálu fototoxicity byl využit software Phototox Version 2.0, vyvinutý na Humboldtově univerzitě v Berlíně (Holzhütter, 1997), dostupný jako freeware na stránkách OECD (www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html).

Hodnoty fluorescenčních jednotek (FSU), generované fluorimetrem BIOTEK, byly importovány ve standardním formátu a počítačový program porovnal odpovídající dvojice experimentů (+UV a -UV), vypočítal hodnoty PIF a MPE, na základě odpovídajících predikčních modelů provedl predikci potenciálu fototoxicity a vypočítal pravděpodobnost toxicity s přihlédnutím k variabilitě jednotlivých experimentů.

Interpretace výsledků

Na základě nařízení Komise (ES) č.440/2008 lze předpovědět, že zkoušená látka s $PIF < 2$ či $MPE < 0,1$ „není fototoxická“. Hodnoty $PIF > 2$ a < 5 či $MPE > 0,1$ a $< 0,15$ předpovídají: „pravděpodobně fototoxická“ a hodnoty $PIF > 5$ či $MPE > 0,15$ předpovídají: „fototoxická“. Pro hodnoty ">PIF" platí, že hodnota ">PIF" > 1 ukazuje na potenciál fototoxicity.

2.2.5.5. Zkouška fototoxicity s využitím modelu EpiDerm™

Zkoušky fototoxicity bergamotových a dalších éterických olejů i vybraných UV filtrů byly prováděny na trojrozměrném modelu lidské kůže EpiDerm™ (MatTek, USA) dle protokolu INVITTOX č.121 - EpiDerm™ Phototoxicity Assay (<http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu>).

Po příjmu zásilky od firmy MatTek byly tkáně EpiDerm™ vyjmuty z transportní agarové destičky, přeneseny do 6-jamkových destiček obsahujících předeřáté medium (0,9 ml) a inkubovány přes noc za účelem odstranění stresových látek vzniklých při transportu.

Po 18-24 hod. preinkubaci byly tkáně přeneseny do 6-jamkových destiček s čerstvým předeřátým medium (0,9 ml) a poté byly exponovány negativní kontrole (deionizovaná voda) nebo zkoušeným vzorkům po dobu 16-18 hod. Každá látka byla zkoušena v 5 koncentracích ředěných sterilní deionizovanou vodou nebo sezamovým olejem (Lamotte GmbH, Německo), na 4 replikátních tkáních (dvě ozářené UV a dvě bez ozáření UV). Látky ředěné vodou byly aplikovány v množství 50 μ l vzorku /tkáň, látky ředěné sezamovým olejem byly aplikovány v množství 20 μ l vzorku na terčíku z filtračního papíru přiloženého na povrch tkáně. Vzhledem ke schopnosti některých látek absorbovat UV záření a fungovat jako UV filtr nejvyšší koncentrace nepřesahovala 10%.

Po celonoční expozici byla polovina tkání (část +UV) ozářena solárním simulátorem (Dr. Hönle, Německo) po dobu cca 60 min tak, že intenzita UVA byla nastavena na 1,6 - 1,8 mW/cm^2 a výsledná dávka UVA dosáhla 6 J/cm^2 . Druhá polovina tkání byla po dobu záření uchována v temnu za laboratorní teploty (část -UV). Poté byly tkáně 20x opláchnuty PBS pomocí stříčky, osušeny na buničině a přeneseny do 6-jamkových destiček naplněných čerstvým předeřátým medium (0,9 ml). Poté byly tkáně inkubovány dalších 18-24 hodin.

Po ukončení post-kultivace byly tkáně přeneseny do 24-jamkových destiček obsahujících medium s rozpuštěným barvivem MTT (0,3 ml) a inkubovány 3 hodiny.

Po obarvení byly tkáně přeneseny do destičky s extrakčním činidlem (2 ml isopropanolu/jamku), roztřepány po dobu 2 hod a výsledné zabarvení supernatantu bylo měřeno na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm. Z naměřených výsledků optické denzity (OD) byla spočítána životnost tkání po aplikaci vzorků dle vzorce: životnost vzorku (%) = OD vzorku / OD negativní kontroly. Pokus splňoval kritéria kvality, pokud průměrná optická hustota OD₅₇₀ negativních kontrol byla $\geq 0,8$ a směrodatná odchylka dvou replikátů tkání ovlivněných testovanou látkou byla $< 30\%$.

Predikční model, založený na výpočtu průměrných životností vzorků s ozářením a bez ozáření, použitý v prevalidační studii (Liebsch et al., 1999), stanoví, že látka je fototoxická, pokud aspoň v jedné koncentraci po ozáření je životnost tkání snížena nejméně o 30% oproti životnosti tkáně exponované stejné koncentraci, ale bez ozáření.

2.2.5.6. Epikutánní test fototoxicity (Human photopatch test)

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

Výběr pokusných osob a postup testování se řídil principy zakotvenými v Mezinárodní etické směrnici pro biomedicínský výzkum zahrnující lidské účastníky (CIOMS, 2002). Studie byla realizována se souhlasem Etické komise Státního zdravotního ústavu Praha. Výběr osob byl prováděn na principu úplné dobrovolnosti. Všichni dobrovolníci byli seznámeni s průběhem studie, splnili podmínky pro zařazení do studie a za tímto účelem vyplnili speciální dotazník včetně informovaného souhlasu.

Studie zahrnovala jednorázový uzavřený kožní test (patch-test v okluzi na spodní části zad) a následné ozáření solárním simulátorem (Dr. Hönle, Německo).

Vzorky byly ředěny ve vodě pro tkáňové kultury nebo v sezamovém oleji (Lamotte GmbH, Bremen). Na spodní části zad dobrovolníků nalevo i napravo od páteře byly aplikovány v okluzi testované vzorky pomocí saturovaných terčů papíru o průměru 0,8 cm určených do náplastí Finn Chamber (Finn Chamber on Scanpor, Epitest Ltd Oy, Finsko). 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 ozáření 15 - 20 minut. Pravá část zad bez ozáření sloužila jako kontrola. Odečet reakcí (erytém, edém) byl prováděn ihned po ozáření a v intervalech 24, 48 a 72 hodin po ozáření.

Pro hodnocení kožních reakcí bylo použito následující čtyřstupňové bodování:

- 0 žádná významná reakce,
- + slabý erytém, edém, suchost či šupinatění na převažující části místa aplikace,
- ++ zřetelný erytém případně přesahující místo aplikace, doprovázený edémem, šupinatěním, případně hemoragií či strupy,
- +++ silný erytém přesahující místo aplikace, doprovázený edémem, hemoragií či tvorbou krusty.

Pro výpočet a vyhodnocení potenciálu fototoxicity (počet pozitivních reakcí/počet subjektů) byly použity hodnoty zaznamenané v intervalech 24, 48 a 72 hodin.

2.3. Výsledky a diskuse

2.3.1. Kožní dráždivost

2.3.1.1. Kožní dráždivost 25 chemických látek

V letech 2003-2007 zorganizovalo Evropské centrum pro validaci alternativních metod ECVAM rozsáhlou validační studii zkoušek kožní dráždivosti in vitro, která zahrnovala i rekonstruované kožní modely EpiDermTM od firmy MatTek, USA, a model EPISKINTM od firmy L'Oréal, Francie (Spielmann et al., 2007; Eskes et al., 2007). V průběhu této studie obě zkoušky dráždivosti na modelech lidské kůže klasifikovaly některé substance odlišně oproti Draizovu testu kožní dráždivosti na králících.

S cílem objasnit nejednoznačné výsledky kožních modelů ve validační studii ECVAM a zároveň optimalizovat protokol kožní dráždivosti s využitím modelu EpiDermTM byla vytvořena pracovní skupina zahrnující Dr. Baskettera a Dr. Marriottovou z laboratoře UNILEVER (Velká Británie), Dr. Liebsche z německého centra pro alternativní metody ZEBET (Německo), Dr. Kandárovou z firmy MatTek (USA) a pracovníky laboratoře NRC pro kosmetiku (SZÚ, Praha). Bylo rozhodnuto vyzkoušet některé z chemických látek z validační studie ECVAM podle modifikovaného SOP pro zkoušku dráždivosti na modelu EpiDermTM s prodlouženou dobou aplikace z 15 na 60 min. Dále bylo ujednáno provést klinickou studii kožní dráždivosti na dobrovolnících metodou 4HPT (viz strana 49).

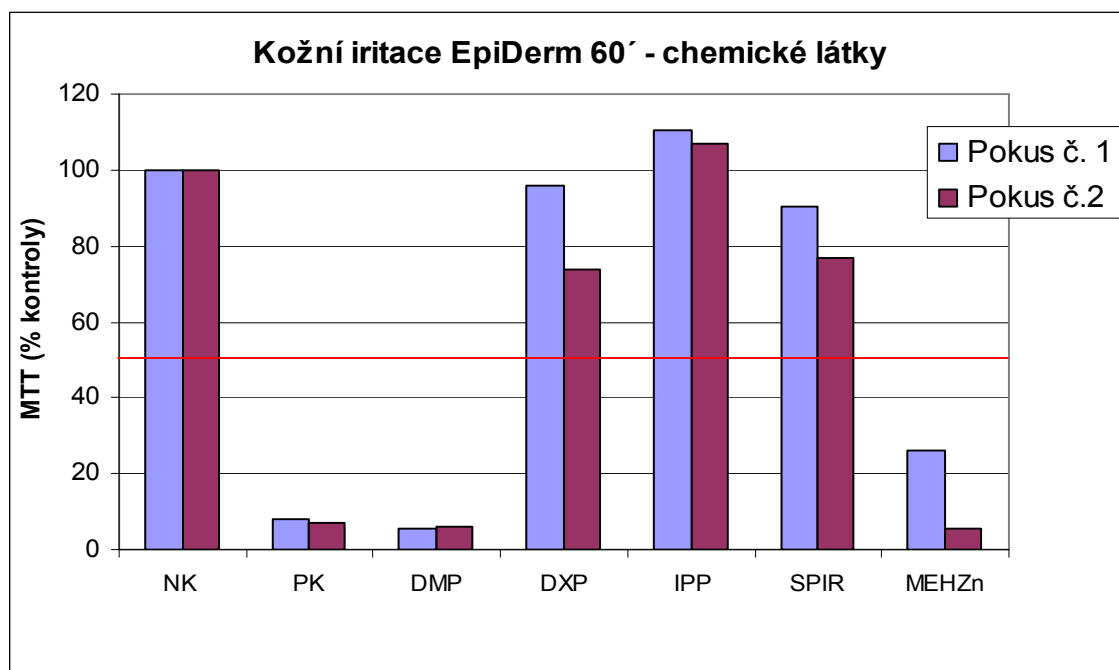
Jednalo se o látky (viz strana 47), které ve validační studii vykazovaly nejednoznačné či hraniční výsledky. Dalších 8 látek (č.3, 4, 8, 10, 13, 15, 17 a 21) bylo v minulosti zkoušeno Dr. Basketterem ve skupině dobrovolníků (Basketter et al., 2004) a v této studii sloužily k ověření transferability zkoušky 4HPT mezi laboratořemi. Před zařazením do klinické studie byl zjištěn toxikologický profil všech látek a substance korozivní či jinak toxikologicky nepříjemné nebyly zkoušeny.

Klasifikace vybraných 25 chemických látek, pocházející z databází Evropského centra pro ekotoxikologii a toxikologii chemikálií - European Centre for the Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC, 1995), z Databáze nových chemikálií (New Chemicals Database, NCD) a z Toxic Substance Control Act (TSCA, databáze zřízená při Environmental Protection Agency EPA, USA), byla převzata z publikací shrnujících validaci rekonstruovaných modelů kůže pro stanovení kožní dráždivosti in vitro (Spielmann et al., 2007; Eskes et al., 2007).

V rámci SZÚ byla zkoušena v optimalizovaném protokolu s 60 min. aplikací na modelu EpiDerm™ dráždivost 5 chemických látek, ostatní výsledky zkoušky in vitro byly převzaty od firmy MatTek. Po zaškolení Dr. Basketterem byly v laboratořích NRC pro kosmetiku (SZÚ) prováděny všechny klinické zkoušky kožní dráždivosti u dobrovolníků.

2.3.1.1.1. Výsledky

V rámci této studie bylo s využitím modelu EpiDerm™ v upraveném protokolu (60 min aplikace) zkoušeno v laboratoři NRC pro kosmetiku 5 chemických látek, poskytnutých do studie oddělením CORRELATE (ECVAM, Itálie): 2-Isopropyl-2-isobutyl-1,3-dimethoxypropan (č.2, DXP); bis[(1-Methylimidazol)-(2-ethyl-hexanoát)], Zn komplex (č.12, MEHZn); Směs isomerů: 1-(2-isopropylfenyl)-1-fenylethan, 1-(3-isopropylfenyl)-1-fenylethan, 1-(4-isopropylfenyl)-1-fenylethan (č.16, IPP); Směs isomerů: 1-(spiro[4.5]dec-7-en-7-yl)pent-4-en-1-on, 1-(spiro[4.5]dec-6-en-7-yl)pent-4-en-1-on (č.18, SPIR); 3,4-Dimethyl-1-H-pyrazol (č.24, DMP). Výsledky kožní dráždivosti in vitro jsou uvedeny na obrázku č. 12.



Obr. 12: Chemické látky - výsledky kožní dráždivosti s využitím modelu EpiDerm™, modifikovaný protokol s aplikací 60 min.

Modifikovaný protokol kožní dráždivosti zahrnoval prodloužení aplikační doby z 15 min na 60 min. Ve zkoušce zahrnující 15 min. aplikaci byly 2 látky klasifikovány jako dráždivé (DMP, MEHZn) a 3 látky jako nedráždivé (DXP, IPP, SPIR). Ani u jednoho ze zkoušených vzorků však modifikací postupu a prodloužením aplikační doby nedošlo ke změně klasifikace.

Ve skupinách dobrovolníků (počet subjektů 29 nebo 30 ve skupině) byl poté proveden epikutánní test kožní dráždivosti. Celkový počet subjektů, u nichž byla vyvolána pozitivní reakce na zkoušenou látku po době expozice až 4 hodiny, byl s využitím Fisherova exaktního testu porovnán s počtem subjektů, u nichž byla vyvolána dráždivá reakce po aplikaci pozitivní kontroly SLS. Látka byla klasifikována jako dráždivá (R38), pokud incidence pozitivních reakcí na zkoušenou látku byla signifikantně vyšší nebo se významně nelišila od incidence pozitivních reakcí vyvolaných v téže skupině dobrovolníků 20% roztokem SLS.

Sumární výsledky zahrnující klasifikaci zkoušených látek podle EU na králících, podle zkoušky na kožním modelu EpiDermTM s využitím dvou různých protokolů (15 min a 60 min aplikace) a podle epikutánního testu 4HPT ve skupině dobrovolníků jsou uvedeny v tabulce č. 10 (strana 70).

Skupina vybraných 25 chemikálií obsahovala dle klasifikace EU na králících 16 iritantů a 9 neiritantů. Ze 16 látek dráždivých na králících jen 5 vyvolalo dráždivé reakce u lidí. Jednalo se o SLS (č.1), kyselinu nonanovou (č.3), kyselinu dekanovou (č.4), heptaldehyd (č.5) a 1-bromhexan (č.9). V případě pozitivní kontroly (20% SLS) byly prokázány jasné pozitivní reakce ve formě erytému u většiny osob ve skupině dobrovolníků (94 pozitivních z celkového počtu 118 subjektů). U dalších výše zmíněných dráždivých látek byla zaznamenána významná incidence pozitivních reakcí (kyselina nonanová: 19/29, kyselina dekanová: 28/29, heptaldehyd: 17/29, 1-bromhexan: 16/30).

Jeden z klasifikovaných iritantů, 1-bromhexan (č.9), vyvolával u všech subjektů silnou senzorickou iritaci ve formě svědění či pálení. Expoziční doba závisela na subjektivním vnímání jednotlivých dobrovolníků a pohybovala se mezi 30 min až 2 hod. I zredukovaná doba aplikace vedla k jednoznačnému vzniku pozitivních reakcí u 16 ze 30 subjektů. Senzorické dráždění bylo v menší míře zaznamenáno i v případě dalšího iritantu klasifikovaného ve zkoušce na králících, di-n-propyldisulfidu (č.7). Počet pozitivních reakcí nestačil však v případě této látky k její klasifikaci jakožto iritantu (6/30).

Žádná z látek klasifikovaných dle EU jako nedráždivá nevyvolala dráždění ani u lidí. Zvýšená incidence pozitivních reakcí (11/30) se objevila po aplikaci 3,4-dimethyl-1-H-pyrazolu, ale reakce byly sotva znatelné, hraniční a většinou zmizely do 24 hod.

Č.	Chemická látka	Klasifikace EU králík	4HPT člověk	Pozitivní reakce	Pozitivní reakce na SLS	EpiDerm 15 min	EpiDerm 60 min
1	20% Natrium-dodecyl-sulfát (Laurylsíran sodný SLS)	R38	I	94/118	94/118	R38	R38
2	2-Isopropyl-2-isobutyl-1,3- dimethoxypropan	R38	NI	6/29	26/29	NI	NI
3	Kyselina nonanová	R38	I	19/29	26/29	R38	R38
4	Kyselina dekanová	R38	I	28/29	26/29	R38	R38
5	Heptaldehyd (heptanal)	R38	I	17/29	23/29	R38	R38
6	Butyl-methakrylát	R38	NI	0/30	22/30	NI	R38
7	di-n-Propyldisulfid	R38	NI	6/30	22/30	NI	NI
8	α -terpineol (2-(4-Methylcyklohex- 3-enyl)-propan-2-ol))	R38	NI	0/29	23/29	NI	R38
9	1-Bromhexan	R38	I	16/30	22/30	NI	R38
10	Dekan-1-ol	R38	NI	1/30	23/30	R38	R38
11	Undec-10-enová kyselina	R38	NI	1/29	23/29	R38	R38
12	bis[(1-Methylimidazol)-(2- ethylhexanoát)], Zn komplex	R38	NI	0/29	26/29	R38	R38
13	Hexyl-salicylát	R38	NI	0/30	22/30	NI	NI
14	Terpinyl-acetát	R38	NI	0/30	22/30	NI	NI
15	Linalyl-acetát	R38	NI	0/30	23/30	NI	NI
16	Směs isomerů: 1-(2-isopropylfenyl)-1-fenylethan, 1-(3-isopropylfenyl)-1-fenylethan, 1-(4-isopropylfenyl)-1-fenylethan	R38	NI	0/29	26/29	NI	NI
17	Heptyl-butyrát	NI	NI	0/30	22/30	NI	NI
18	Směs isomerů: 1-(spiro[4.5]dec-7- en-7-yl)pent-4-en-1-on, 1-(spiro[4.5]dec-6-en-7-yl)pent-4- en-1-on	NI	NI	0/29	26/29	NI	NI
19	4-Methylthio-benzaldehyd	NI	NI	0/30	22/30	NI	R38
20	Hydroxycitronellal (3,7-dimethyl-7- hydroxyoktanal)	NI	NI	0/30	23/30	NI	NI
21	Kyselina dodekanová	NI	NI	0/29	23/29	NI	NI
22	Dipropylenglykol	NI	NI	0/30	22/30	NI	NI
23	Kyselina 1-naftalenoctová	NI	NI	0/30	22/30	NI	NI
24	3,4-Dimethyl-1-H-pyrazol	NI	NI	11/29	26/29	R38	R38
25	1-Brom-4-chlorbutan	NI	NI	0/30	22/30	NI	R38

R38 (I) - dráždí kůži (iritant), NI - nedráždí kůži (neiritant)

Tab. 10: Sumární výsledky klasifikace kožní dráždivosti chemických látek metodami in vivo a in vitro

Údaje uvedené v tabulce č. 11 ukazují míru konkordance mezi klasifikací látek s využitím metody EU na králících, klasifikací na základě zkoušky na rekonstruovaném kožním modelu EpiDermTM s použitím obou protokolů (15 min/60 min expozice) a klasifikací dle výsledků získaných v klinické studii ve skupině dobrovolníků (4HPT). Výsledky zkoušky na kožním modelu s využitím protokolu s 15 min aplikací byly převzaty z validační studie ECVAM, výsledky ze zkoušky se 60 min aplikací byly částečně získány v SZÚ nebo dodány z interních zdrojů firmy MatTek.

Způsob klasifikace	Citlivost	Specifičnost	Přesnost
Test na králících ► 4HPT	100,0% (5/5)	45,0% (9/20)	56,0%
4HPT ► Test na králících	31,3% (5/16)	100,0% (9/9)	56,0%
15 min EpiDerm ► Test na králících	43,8% (7/16)	77,8% (7/9)	56,0%
60 min EpiDerm ► Test na králících	62,5% (10/16)	66,7% (6/9)	64,0%
15 min EpiDerm ► 4HPT	80,0% (4/5)	75,0% (15/20)	76,0%
60 min EpiDerm ► 4HPT	100,0% (5/5)	60,0% (12/20)	68,0%

Tab. 11: Konkordance klasifikace chemických látek metodami in vivo a in vitro

V této studii s limitovaným počtem zkoušených látek se Draizův test na králích vyznačoval ve vztahu k člověku 100% citlivostí (5 iritantů pro člověka bylo správně klasifikováno jako iritanty), ale jenom 45% specifičností (pouze 9 z 20 neiritantů pro člověka bylo klasifikováno jako neiritant na králících), což vedlo k celkové přesnosti 56%. V rámci této studie se zkouška dráždivosti s využitím modelu EpiDermTM (s 15 min, resp. 60 min aplikací) vzhledem ke králíkům vyznačovala citlivostí 43,8%, resp. 62,5%. Prodloužená doba expozice zlepšila citlivost zkoušky, ale zároveň zvýšila riziko falešně pozitivních výsledků a tudíž snížila její specifičnost (ze 77,8% na 66,7%). Zkouška na modelu EpiDermTM vzhledem ke člověku se vyznačovala 80%, resp. 100% citlivostí, specifičnost byla vyhodnocena ve výši 75%, resp. 60% při prodloužené expozici. Celková přesnost zkoušky na modelu EpiDermTM s použitím dvou různých protokolů se pohybovala mezi 68% a 76% a byla vyšší, než přesnost Draizovy zkoušky na králících.

2.3.1.1.2. Diskuse

Prokoly nových toxikologických metod in vitro musí být vyvinuty a optimalizovány tak, aby vedly k výsledkům srovnatelným či lepším, než poskytují právně závazné referenční metody. Pro mnoho látek, včetně těch zkoušených ve validačních studiích kožní dráždivosti (Fentem et al., 2001; Cotovio et al., 2005; Kandárová et al., 2005), jsou údaje in vivo velmi omezeně dostupné. Klasifikace kožní dráždivosti je často výsledkem zkoušení na 3 králících v jedné laboratoři. Informace o mezilaboratorní reprodukovatelnosti této zkoušky prakticky neexistují. Vzhledem k tomu, že ve validační studii kožní dráždivosti vedené ECVAM (Spielmann et al., 2007) bylo zaznamenáno několik nesprávných klasifikací s použitím obou hodnocených kožních modelů (EPISKINTM, EpiDermTM), byla realizována v SZÚ klinická studie zaměřená na hodnocení dráždivosti vybraných látek bez závažných toxikologických vlastností přímo na člověku.

Z tabulky č. 10 vyplývá, že z 16 iritantů klasifikovaných na králících jen 5 vyvolalo dráždění u člověka. Tento výsledek je v souladu s předchozími studiemi publikovanými Basketterem et al. (1999, 2004), které odhalily, že asi 40% iritantů pro králíky nevyvolalo iritaci při zkoušce 4HPT ve skupině dobrovolníků. Tato studie na omezeném počtu chemických látek ukázala, že zkouška na králících se vyznačuje 100% citlivostí, ale pouze 45% specifičností, což naznačuje, že Draizův test správně identifikuje všechny iritanty pro člověka, ale 55% chemických látek je nesprávně klasifikováno a označeno jako dráždivé. I přes nutné respektování principu předběžné opatrnosti je potřeba zvážit, že nesprávné označení více než poloviny nových nedráždivých látek jakožto iritantů může mít velký ekonomický dopad na výrobu, transport, manipulaci a konečné užití řady chemických látek, např. jako ingrediencí spotřebních výrobků.

Epikutánní zkouška kožní dráždivosti u lidí (4HPT) slouží k identifikaci hazardu kožní dráždivosti, nikoli rizika. Je založena na režimu progresivní expozice spojené s použitím srovnávací kontroly (SLS), jehož cílem je zabránit vyvolání silnějších dráždivých reakcí a zachovat všechny etické principy biomedicínského výzkumu (CIOMS, 2002). Tato metoda má vysokou mezilaboratorní reprodukovatelnost (Griffiths et al., 1997) a výsledky nejsou závislé na typu kůže, pohlaví či věku subjektů (Basketter et al., 1996; Robinson et al., 2001). Chemické látky, zkoušené v předchozích studiích Dr. Basketterem v laboratořích UNILEVER, v podmínkách zkoušení v laboratořích SZÚ vykazovaly obdobné výsledky a stejnou klasifikaci (Basketter et al., 2004), čímž byla potvrzena vysoká reprodukovatelnost výsledků a transferabilita zkoušky 4HPT mezi laboratořemi.

Klinická studie potvrdila již dříve udávanou skutečnost, že neexistuje korelace mezi subjektivním senzoričkým vnímáním svědění či pálení a následným rozvojem kožní reakce (Basketter a Griffiths, 1993; Coverly et al., 1998). V celé skupině subjektů vyvolala zkoušená látka 1-bromhexan silnou senzoričkovou dráždivost vyžadující zkrácení expoziční doby, ale následné projevy kožní iritace se objevily jen u 16 ze 30 subjektů. V případě látky di-n-propyldisulfidu byly u dobrovolníků zaznamenány senzoričkové projevy, ale pouze u šesti z nich se následně vyvinula rozpoznatelná kožní reakce. Tyto poznatky potvrzují obecně přijímaný závěr, že senzoričkové reakce by neměly být součástí hodnocení kožních reakcí, což odpovídá i postupu zkoušky na králících, kde senzoričkové účinky nelze hodnotit.

V současné limitované studii na 25 chemických látkách se projevila poměrně špatná konkordance mezi Draizovým testem a kožní reakcí u lidí (přesnost pouze 56%). Zkouška založená na kožním modelu EpiDermTM prokázala lepší konkordanci (přesnost 76%, resp. 68%) pravděpodobně proto, že rekonstruovaná lidská epidermis je svou strukturou bližší lidské kůži in vivo než kůže králíků. Kožní model EpiDermTM navíc neobsahuje vlasové kanálky, které v okluzivních podmínkách in vivo napomáhají penetraci chemických látek do hlubších vrstev epidermis či dermis. Protokol zkoušky in vitro také počítá se slabší kožní bariérou modelu, a proto expozice je 15 min/60 min oproti 4 hodinám u lidí i králíků in vivo.

Výsledky této studie, publikované na Mezinárodním kongresu o alternativních metodách v Japonsku (Jírová et al., 2008) a posléze v časopise Contact Dermatitis (Jírová et al., 2010), přispěly ke změně kritérií pro hodnocení charakteristik chování dalších modelů rekonstruované kůže in vitro pro dráždění kůže, navrhovaných pro validaci. V roce 2009 vydal ECVAM revidované standardy chování a seznam referenčních látek pro stanovení hodnoty přesnosti a spolehlivosti nových modelů vzhledem k validovaným referenčním metodám (ECVAM, 2009a). Ze seznamu referenčních dráždivých látek byly vyřazeny α -terpineol a butyl-methakrylát, které nevyvolávají dráždivé reakce u lidí. U dalších dvou látek dráždivých na králících, a to u 1-dekanolu a di-n-propyldisulfidu, bylo přidáno označení "chemikálie dráždivé pro králíka, ale nedráždivé pro člověka". V návrhu metodického pokynu OECD pro zkoušení kožní dráždivosti in vitro s využitím rekonstruované epidermis, který je otevřen k připomínkování (<http://www.oecd.org>), je zapracován již revidovaný seznam referenčních látek. V Příloze 2 týkající se hodnocení charakteristik chování navrhovaných modelů rekonstruované lidské epidermis se nově objevilo specifické omezení týkající se citlivosti navrhované metody in vitro v tom smyslu, že pouze dvě dráždivé referenční látky, 1-dekanol a di-n-propyldisulfid, mohou být klasifikovány jako nedráždivé ve více než jedné laboratoři účastnící se validační studie. Přestože citlivost validované referenční metody

(EPISKINTM), vypočítaná na základě zkoušení 20 referenčních látek, je přes 90%, požadovaná citlivost navrhované metody byla stanovena na 80% vzhledem k tomu, že 1-dekanol (látko klasifikovaná validovanou referenční metodou jako dráždivá) a di-n-propyldisulfid (látko klasifikovaná referenční validovanou metodou jako nedráždivá, tj. falešně negativní) nejsou dráždivé pro člověka, přestože jsou klasifikovány jako dráždivé v Draizově testu na králících (OECD, 2009b). Tímto přístupem je zohledněna možnost, že nová navrhovaná metoda může mít lepší schopnost klasifikovat dráždivé látky pro člověka než současná validovaná referenční metoda využívající kožní model EPISKINTM.

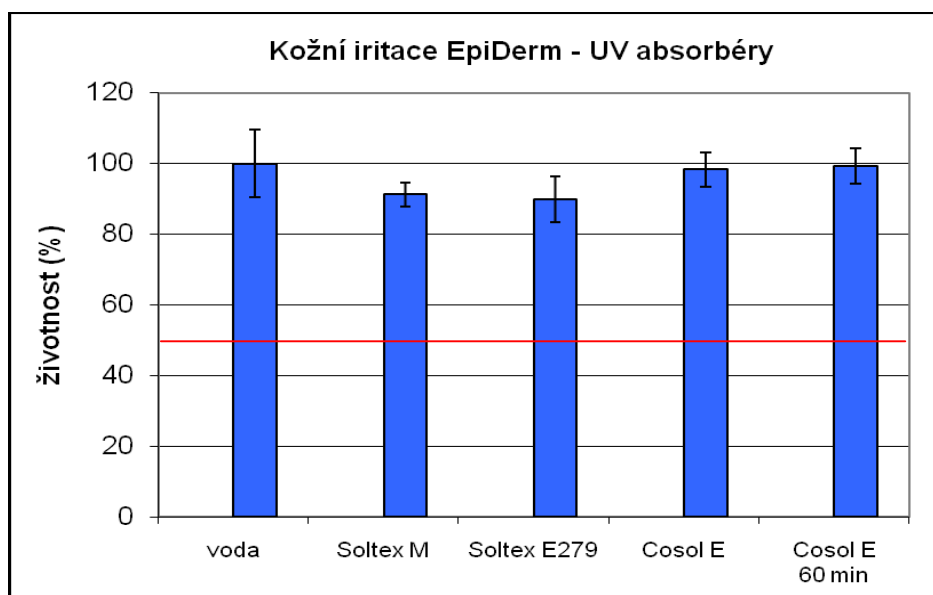
Závěrem lze konstatovat, že zkouška ve skupině dobrovolníků 4HPT je důležitým zdrojem informací pro přístup založený na průkaznosti důkazů ("weight of evidence") při klasifikaci hazardu chemických látek, protože využívá hodnocení kožní dráždivosti přímo u lidí, pro něž je klasifikace určena. Proto by měla v budoucnosti být humánní data využívána při validaci alternativních metod a vývoji integrovaných strategií zkoušení (Hoffmann et al., 2008), protože jen výsledky ověřené na lidech poskytují konečné rozhodnutí o predikční schopnosti nových alternativních metod.

2.3.1.2. Kožní dráždivost UV filtrů

V rámci výzkumného projektu dotovaného MPO s názvem "Fotoprotektivní pracovní prostředky" (FT-TA3/050), realizovaného ve spolupráci s Výzkumným ústavem organických syntéz, a.s., byly navrženy, syntetizovány a zkoušeny nové druhy UV absorbérů. Tyto sloučeniny byly podrobeny celé škále screeningových toxikologických zkoušek, v první řadě zkoušce fototoxicity (viz kapitola 2.3.3.3.) a u vybraných vzorků i zkoušce kožní dráždivosti s využitím modelu lidské epidermis EpiDermTM (ES, 2009). Zkouška kožní dráždivosti UV filtrů označených jako Soltex E279, Soltex M a Cosol E byla prováděna dle SOP firmy Mattek, verze 5.0, pro klasifikaci chemických látek, použitého ve 2. fázi validační studie kožní dráždivosti ECVAM, s aplikací látek po dobu 15 min (ECVAM, 2004). Vzorek Cosol E byl zkoušen také v modifikovaném protokolu s prodlouženou dobou aplikace na 60 min (MatTek, 2009).

2.3.1.2.1. Výsledky

Výsledky zkoušky kožní dráždivosti in vitro jsou znázorněny na obrázku č. 13. Žádný ze zkoušených vzorků neprokázal potenciál kožní dráždivosti, tj. nezpůsobil snížení životnosti tkání na 50% oproti kontrole (destilovaná voda). Ani prodloužená aplikace Cosolu E na 60 min nevedla k průkazu potenciálu kožní dráždivosti tohoto UV filtru.



Obr. 13: Kožní dráždivost UV absorbérů s využitím modelu EpiDerm™

2.3.1.2.2. Diskuse

Současné fotoprotektivní prostředky by měly poskytovat širokospektrální ochranu před UV zářením a zároveň být bezpečné pro zdraví, fotostabilní, voděodolné a snadno zapracovatelné do formulací kosmetických prostředků. Vývoj takových látek je velmi obtížný, srovnatelný s vývojem nového léčiva. Je potřeba syntetizovat desítky molekul a podrobit je screeningovým toxikologickým zkouškám, než se podaří objevit nový vhodný UV absorbér vyhovující všem výše uvedeným kritériím (Nohynek a Schaefer, 2001). Před zařazením nové substance na seznam povolených UV filtrů je pak potřeba předložit informace o provedení řady toxikologických zkoušek včetně kožní dráždivosti (SCCNFP/0690/03).

V rámci projektu MPO s názvem “Fotoprotektivní pracovní prostředky“ byla zkoušena fototoxicita a dráždivost řady nových syntetizovaných UV absorbérů. Zkouška kožní dráždivosti na rekonstruovaném modelu EpiDerm™ odhalila, že ani jeden ze tří zkoušených nových UV filtrů nemá potenciál dráždivosti pro kůži a tyto substance mohou být zařazeny do baterie dalších biologických zkoušek. Souběžně probíhaly zkoušky fototoxicity všech nově syntetizovaných UV absorbérů a souhrnné výsledky studie těchto fotoprotektivních substancí jsou diskutovány v kapitole 2.3.3.3 (strana 110).

2.3.2. Oční dráždivost

2.3.2.1. Oftalmologické přípravky

Při zavádění metod in vitro pro zkoušení oční dráždivosti, tj. zkoušek cytotoxicity NRR a NRU, a při zvažování vhodných predikčních modelů pro tyto metody, byly vybrány ke zkoušení vzorky, u nichž při jednorázové aplikaci prokazatelně nedochází ke vzniku oční iritace. Byla použita pitná voda, fyziologický roztok a oftalmologické přípravky, které jsou dlouhodobě dostupné na trhu a u nichž nejsou známy žádné negativní účinky ve smyslu oční dráždivosti.

2.3.2.1.1. Výsledky

Ve zkoušce cytotoxicity NRR s krátkodobou aplikací 1 min. žádný z testovaných vzorků neprokázal toxické účinky. Životnost buněčné kultury neklesla pod 85% oproti kontrole a proto nebylo možné spočítat hodnotu NRR_{50} , tj. koncentraci, při níž dojde k uvolnění 50% NR z buněk oproti kontrole.

Ve zkoušce cytotoxicity NRU s expozicí vzorkům po 24 hod. přípravky Ophtalmo-Septonex, Oční voda s kyselinou boritou, Garasone a Sanorin-Analergin vyvolaly velmi nízkou toxickou odezvu s hodnotami NRU_{50} v rozmezí 16 299,2 – 35 805,3 $\mu\text{g/ml}$. Ostatní vzorky nebyly toxické do nejvyšší testované koncentrace 100 000 $\mu\text{g/ml}$ (tabulka č. 12).

Vzorek	NRR	NRU
	životnost (% K)	NRU_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ophtalmo-Septonex	$94,3 \pm 4,6$	$16\,299,2 \pm 1064,4$
Oční voda s kyselinou boritou	$91,2 \pm 0,6$	$29\,076,7 \pm 5435,9$
Garasone	$91,8 \pm 1,0$	$35\,805,3 \pm 503,4$
Visine	$97,3 \pm 3,0$	>100 000
Ophtal	$102,9 \pm 5,6$	>100 000
Sanorin-Analergin	$85,8 \pm 6,0$	$31\,164,9 \pm 1302,3$
pitná voda	$85,3 \pm 7,4$	>100 000
fyziologický roztok	$94,4 \pm 6,7$	>100 000

Tab. 12: Oftalmologické přípravky - výsledky zkoušek oční dráždivosti NRR a NRU

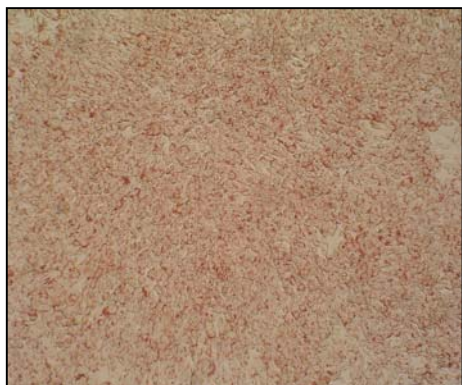
2.3.2.2. Chemické látky

Tato studie měla za cíl získat dalších poznatky o skupině chemických látek, které byly zkoušeny z hlediska kožní dráždivosti metodami in vitro a in vivo (viz kapitola 2.3.1.1.). Vybrané chemikálie, u nichž byla známa kožní dráždivost u lidí, byly podrobeny zkoumání

z hlediska jejich možné dráždivosti pro oko s využitím baterie in vitro metod. U šesti z nich byla známa i oční dráždivost in vivo, klasifikovaná Draizovým testem na králících (ECETOC, 1998). Byly použity zkoušky využívající buněčnou kulturu 3T3 Balb/c fibroblastů (NRR), rekonstruovaný model rohovky EpiOcularTM od firmy MatTek, USA a test na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya, HET-CAM (výsledky byly laskavě poskytnuty RNDr. Stanislavem Janouškem, SZÚ).

2.3.2.2.1. Výsledky

Ve zkoušce oční dráždivosti NRR bylo možné určit hodnotu NRR_{50} pouze u 5 chemických látek, způsobujících narušení membrán a vyplavení NR. U těchto látek ve vzrůstajících koncentracích bylo možné i mikroskopicky zřetelně odlišit živou, nenarušenou buněčnou kulturu (obr. 14) oproti kultuře zcela destruované (obr. 15). Tento jednoznačný účinek byl zaznamenán v případě SLS, alfa terpineolu, dipropylenglykolu, kyseliny nonanové a 4-methylthio-benzaldehydu.

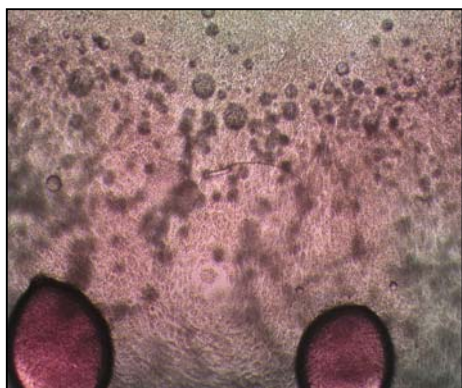


Obr. 14: Kontrolní kultura (PBS)
zvětšení 200x

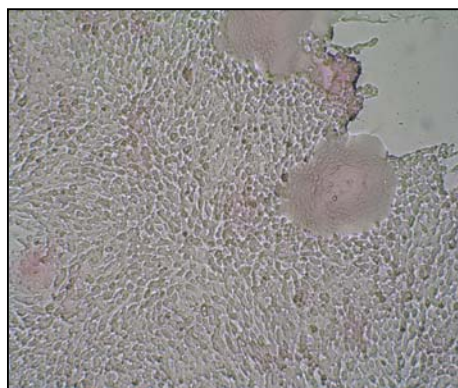


Obr. 15: Iritační účinek (dipropylenglykol)
zvětšení 200x

Při striktním dodržení protokolu INVITTOX č. 54, tj. po jednorázovém oplachu zkoušené látky, byl u řady chemických látek pozorován toxický účinek bez vyplavení NR z buněk. Tento jev byl způsoben buď nedostatečným oplachem chemické látky nebo fixací buněk bez narušení membrán. Typickým příkladem neopláchnuté látky, která absorbovala uvolněnou neutrální červeň a tak vedla k falešně negativnímu výsledku, je hydroxycitronellal (obr. 16) a heptaldehyd. Fixační účinky se projeví u kyseliny dekanové (obr. 17), dekan-1-olu, undec-10-enové kyseliny a linalyl-acetátu.



Obr. 16: Falešně negativní účinek
(hydroxycitronellal)
zvětšení 200x

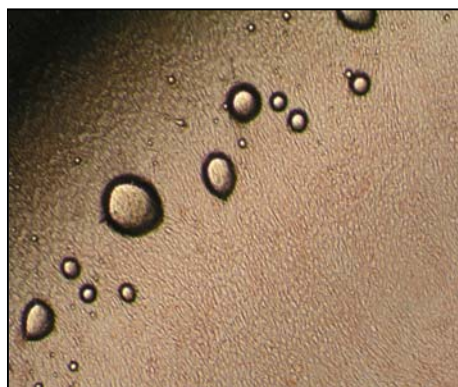


Obr. 17: Fixační účinek
(kyselina dekanová 500 mg/ml)
zvětšení 200x

Řada zkoušených chemických látek nevyvolala po aplikaci na buněčnou kulturu žádné toxické účinky ani po naředění do nejvyšší koncentrace 1000 mg/ml, ani po aplikaci látky samotné. Dvě pevné látky, kyseliny naftalenoctová a dodekanová, byly aplikovány v suspenzi v nejvyšší možné koncentraci vzhledem k minimální rozpustnosti v PBS, tj. 250 mg/ml resp. 500 mg/ml. Mikroskopické hodnocení odhalilo, že ani jedna z těchto krystalických, ve vodě nerozpustných látek nemá toxický účinek na buněčnou kulturu fibroblastů (obr. 18). Mezi další netoxické látky patřil butyl-metakrylát, di-n-propylsulfid, hexyl-salicylát, terpinyl-acetát, heptyl-butyát a 1-bromhexan (obr. 19).



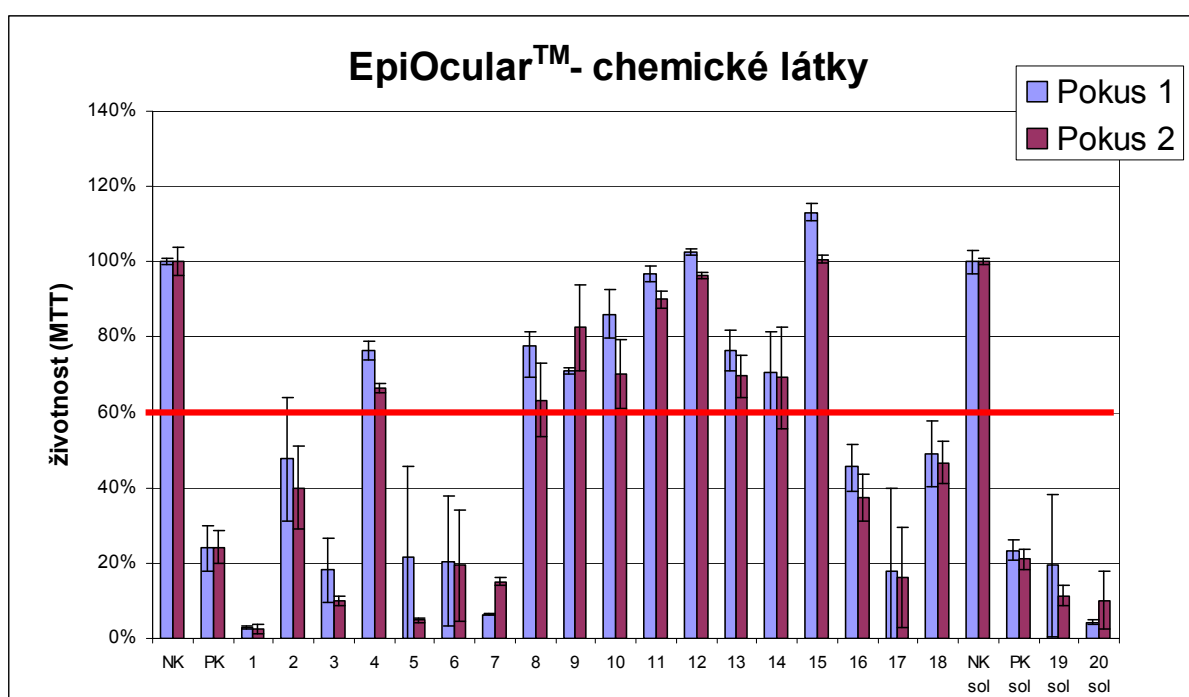
Obr. 18: Netoxický účinek
(kys. dodekanová 250 mg/ml)
zvětšení 200x



Obr. 19: Netoxický účinek (bromhexan)
zvětšení 200x

Ve zkoušce oční dráždivosti s využitím modelu EpiOcularTM byly ve dvou nezávislých pokusech testovány účinky čistých chemických látek bez ředění (viz strana 51). Dvě pevné látky, kyselina dekanová a undec-10-enová, se po zahřátí na 37°C změnilly na kapaliny a byly aplikovány jako tekuté látky. Potenciál dráždivosti pro oko, projevující se jako snížení životnosti pod 60% oproti negativní kontrole, byl pozorován u 20% SLS, kyseliny nonanové, heptaldehydu, kyseliny dekanové, kyseliny undec-10-enové, α -terpineolu, 4-methylthiobenzaldehydu, hydroxycitronellalu, 1-brom-4-chlorbutanu a dvou pevných látek, kyseliny 1-naftalenocetové a dodekanové.

Výsledky jsou shrnuty v obrázku č. 20.



Obr. 20: Oční dráždivost chemických látek s využitím modelu EpiOcularTM

Tabulka č. 13 shrnuje veškeré získané údaje o 20 zkoušených chemických látkách v této studii. Zahrnuje dostupná data o oční dráždivosti in vivo, klasifikovaná Draizovým testem na králících (ECETOC, 1998), výsledky oční dráždivosti na modelu EpiOcularTM, hodnoty NRR₅₀ ze zkoušky cytotoxicity NRR a hodnoty iritačního skóre (IS) ze zkoušky HET-CAM.

č.	Chemická látka	ECETOC in vivo	EpiOcular živ. (%)	NRR ₅₀ (mg/ml)	HET-CAM (IS)
1	3% SLS	3% - NC	-	177.5 ± 16.1	15.1 ± 1.8
	20% SLS	15% - R41	2,7 ± 0,2	21.3 ± 0.8	13.2 ± 2.1
	SLS	30% - R36	-	2.7 ± 1.1	12.3 ± 3.2
2	Kyselina nonanová		43,8 ± 3,8	46.1 ± 2.7	14.8 ± 2.5
3	Heptaldehyd		14,0 ± 4,1	780.4*	6.9 ± 1.8
4	Dekan-1-ol		71,6 ± 5,0	dráždí*	7,5 ± 3,3
5	Kyselina dekanová (37°C - kapalina)		13,2 ± 8,4	dráždí*	7.1 ± 1.4
6	Kyselina undec-10-enová (37°C - kapalina)		19,9 ± 0,5	dráždí*	8.6 ± 2.4
7	α- terpineol		10,7 ± 4,3	22.5 ± 11.4	7.5 ± 1.9
8	Butyl-methakrylát		70,4 ± 7,2	nedráždí	8.6 ± 2.5
9	1-Bromhexan		76,8 ± 5,7	nedráždí	3.2 ± 1.8
10	Linalyl-acetát		78,2 ± 7,9	dráždí*	5.4 ± 2.1
11	di-n-Propyl disulfid	NC	93,4 ± 3,4	nedráždí	2.5 ± 2.1
12	Hexyl-salicylát		99,4 ± 3,2	nedráždí	0.7 ± 0.2
13	Terpinyl-acetát		73,1 ± 3,4	nedráždí	5.6 ± 2.3
14	Dipropylenglykol		69,9 ± 0,7	697.3 ± 74.9	15.8 ± 3.2
15	Heptyl-butyát		107,0 ± 6,2	nedráždí	0.4 ± 0.2
16	4-Methylthio-benzaldehyd	NC	41,6 ± 4,2	437.7 ± 112.3	3.9 ± 1.8
17	Hydroxycitronellal		16,9 ± 0,7	dráždí *	8.3 ± 2.7
18	1-Brom-4-chlorbutan	NC	47,9 ± 1,2	nedráždí	8.8 ± 3.3
19	Kyselina 1-naftalenoctová (pevná)	R41	15,4 ± 4,1	>250 nedráždí ^Δ	0.3 ± 0.1
20	Kyselina dodekanová (pevná)	R41	7,2 ± 2,9	>500 nedráždí ^Δ	0.5 ± 0.2

NC - neklasifikováno (nedráždí oko), R36 - dráždí oko, R41 - leptá oko

* - falešně negativní výsledek způsobený fixací buněk či absorpcí NR, dráždění potvrzeno mikroskopicky

^Δ - negativní výsledek při nejvyšší možné testované koncentraci potvrzen mikroskopicky

Predikční model NRR: NC - $NRR_{50} \geq 1000$; R36 - $NRR_{50} < 1000$ a $>NRR_{50}(\text{SLS } 20\%)$; R41 - $NRR_{50} \leq NRR_{50}(\text{SLS } 20\%)$

Predikční model EpiOcular™: NC - životnost >60% kontroly; R36 - životnost ≤60% kontroly.

Predikční model HET-CAM: NC - IS 0.0 - 0.9; R36/I - IS 1.0 - 4.9; R36/II - IS 5.0 - 8.9; R41 - IS 9.0 - 21.0.

Tab. 13: Sumární data oční dráždivosti 20 chemických látek

2.3.2.2.2. Statistické zhodnocení

Shoda klasifikace 20 chemických látek pomocí metod NRR, EpiOcular™ a HET-CAM byla hodnocena pomocí koeficientu shody kappa (Siegel a Castellan, 1988). Nejvyšší statisticky významná shoda byla zaznamenána mezi metodami HET-CAM a NRR (75%), nižší shoda byla zaznamenána mezi metodami NRR a EpiOcular™ (70%). Mezi metodami HET-CAM a EpiOcular™ signifikantní shoda nebyla nalezena (tab. 14).

Korelace metod	shodnost (%)	kappa	p-hodnota
HET-CAM vs. NRR	75,0	0,4681	0,0067*
HET-CAM vs. EpiOcular	55,0	0,0426	0,4111
NRR vs. EpiOcular	70,0	0,3939	0,0391*

Tab. 14: Statistické hodnocení shody klasifikace oční dráždivosti 20 chemických látek s využitím metod NRR, EpiOcularTM a HET-CAM

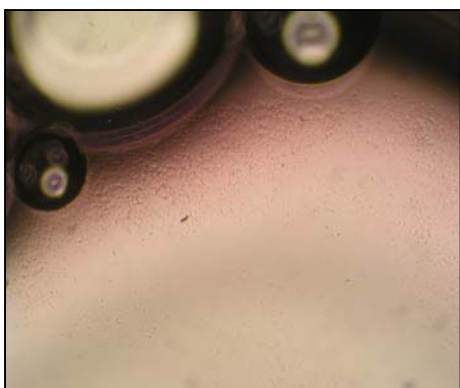
2.3.2.3. Kosmetické prostředky

Jako další skupina látek zkoušených z hlediska potenciálu oční dráždivosti bylo vybráno 9 komerčně dostupných čisticích kosmetických přípravků na bázi tenzidů. Jako referenční látka byl použit laurylsíran sodný (SLS) v různých koncentracích.

Zkoušení zahrnovalo metody využívající buněčnou kulturu 3T3 Balb/c fibroblastů (NRR a NRU), rekonstruovaný model rohovky EpiOcularTM od firmy MatTek, USA, a test na chorioalantoidní membráně kuřecího embrya, HET-CAM (výsledky byly laskavě poskytnuty RNDr. Stanislavem Janouškem, SZÚ).

2.3.2.3.1. Výsledky

Protokol zkoušky oční dráždivosti NRR byl v případě kosmetických prostředků modifikován ve smyslu zlepšení oplachu vzorků po aplikaci. Tenzidové přípravky ve vysokých koncentracích nebo neředěné vzhledem ke své vysoké viskozitě zůstávaly po jednorázovém oplachu v jamkách, zadržovaly uvolněnou neutrální červen a vedly tak k falešně negativním výsledkům. Mikroskopické hodnocení potvrdilo toto zjištění (obr. 21). Teprve opakovaný oplach umožnil odstranění uvolněné NR z buněk, stanovení jejího množství a výpočet hodnot NRR₅₀ (obr. 22).



Obr. 21: Šampon č.4 po 1 oplachu
zvětšení 200x



Obr. 22: Šampon č.4 po opakovaném
oplachu, zvětšení 200x

Souhrnné výsledky klasifikace potenciálu dráždivosti vybraných výrobků metodami in vitro jsou uvedeny v tabulce č.15. Zkouška s využitím modelu EpiOcularTM klasifikovala pouze vzorek č. 2 (Šampon proti lupům s pyrithionem zinečnatým na mastné vlasy) jakožto výrobek s potenciálem dráždivosti pro oko. Při použití zkoušek cytotoxicity NRR a NRU vykazovaly všechny vzorky potenciál dráždivosti, nicméně obě metody shodně určily vzorek č.1 (Dětský šampon) a č.5 (Ekologické tekuté mýdlo) jakožto výrobky s nejvyššími hodnotami NRR₅₀, resp. NRU₅₀, tj. přípravky s nejnižším potenciálem dráždivosti pro oko. Ve zkoušce HET-CAM byly všechny vzorky klasifikovány jako dráždivé, nejnižší iritační skóre bylo zaznamenáno u vzorků č. 1, 2, 5, 7 a 8.

	Vzorek	NRR	EpiOcular	NRU	HET-CAM
		NRR ₅₀ (mg/ml)	ET50 (min.)	NRU ₅₀ (µg/ml)	Iritační skóre
1	Dětský šampon	332.4 ± 105.8	44,9	382.8 ± 33.9	4.8 ± 2.5
2	Šampon proti lupům s pyrithionem zinečnatým na mastné vlasy	60.1 ± 6.1	16,1	9.8 ± 3.7	8.8 ± 3.1
3	Sprchový gel s pantenolem	83.1 ± 26.1	32,4	56.4 ± 9.6	16.5 ± 1.6
4	Šampon pro běžné použití	172.0 ± 44.4	38,3	15.3 ± 1.6	10.9 ± 2.0
5	Ekologické tekuté mýdlo	544.4 ± 174.5	84,4	193.6 ± 78.0	7.6 ± 1.9
6	Šampon proti lupům s piroctonem olaminu	85.4 ± 30.4	41,8	59.6 ± 4.0	10.0 ± 2.0
7	Sprchový šampon pro běžné použití	51.7 ± 18.0	33,5	51.2 ± 3.7	7.8 ± 0.6
8	Dětské tekuté mýdlo	343.1 ± 63.3	41,9	61.2 ± 3.7	15.4 ± 1.5
9	Sprchový gel s minerálními solemi	131.9 ± 52.8	38,5	99.3 ± 18.9	8.8 ± 0.7
	SLS	2.7 ± 1.1	netestováno	7.6 ± 4.6	12.3 ± 3.2
	SLS 20%	21.3 ± 0.8	netestováno	61.7 ± 9.2	13.2 ± 2.1
	SLS 3%	177.5 ± 16.1	netestováno	463.0 ± 89.1	15.1 ± 1.8

NC - neklasifikováno (nedráždí oko), R36 - dráždí oko (R36/I slabě, R36/II středně dráždí), R41 - silně dráždí až leptá oko

Predikční model NRR: NC - NRR₅₀ ≥ 1000; R36 - NRR₅₀ < 1000 a >NRR₅₀(SLS 20%);

R41 - NRR₅₀ ≤ NRR₅₀(SLS 20%)

Predikční model EpiOcularTM: NC - ET50 >256-26.5 min; R36/I - ET50 <26.5-11.7 min;

R36/II - ET50 <11.7-3.45; R41 - ET50 <3.45

Predikční model NRU: NC - NRU₅₀ ≥ 10 000; R36 - NRU₅₀ < 10 000 a >NRU₅₀(SLS 20%);

R41 - NRU₅₀ ≤ NRU₅₀(SLS 20%).

Predikční model HET-CAM: NC - IS 0.0 - 0.9; R36/I - IS 1.0 - 4.9; R36/II - IS 5.0 - 8.9; R41 - IS 9.0 - 21.0.

Tab. 15: Kosmetické prostředky - výsledky zkoušek oční dráždivosti NRR, EpiOcularTM, NRU a HET-CAM

2.3.2.3.2. Statistické hodnocení

V případě souboru kosmetických prostředků byla data získána ve formě číselných hodnot reprezentujících spojitou veličinu. Pro analýzu asociace mezi metodami byl použit Spearmanův pořadový korelační koeficient (Siegel a Castellan, 1988).

Asociace mezi metodami	korelační koeficient	p-hodnota
NRR vs. EpiOcular	0,8667	0,0025*
NRR vs. NRU	0,4909	0,1497
NRR vs. HET-CAM	-0,2432	0,4984
NRU vs. EpiOcular	0,8516	0,0036*
NRU vs. HET-CAM	-0,3769	0,2830
EpiOcular vs. HET-CAM	-0,3874	0,3029

Tab. 16: Statistické hodnocení korelace klasifikace oční dráždivosti 20 chemických látek s využitím metod NRR, NRU, EpiOcularTM a HET-CAM

Statisticky významné korelace byly prokázány mezi metodami NRR/EpiOcularTM a NRU/EpiOcularTM. Mezi NRR a NRU byla zjištěna korelace střední velikosti, která však nevyšla významně, pravděpodobně v důsledku malého počtu zkoušených vzorků.

2.3.2.4. Diskuse

Zkouška oční dráždivosti oftalmologických přípravků metodou NRR potvrdila, že při jednorázové aplikaci tyto vzorky nemají potenciál dráždivosti. Při delší aplikaci (24 hod) ve zkoušce NRU se projevila relativně vyšší toxicita u vzorků obsahujících účinné antimikrobiální látky. Je známo, že přítomnost konzervačních či antimikrobiálních látek v oftalmologických přípravcích může při dlouhodobém užívání vést k toxickým či zánětlivým procesům na povrchu oka (Noecker, 2001). Tato studie potvrdila, že zkouška cytotoxicity NRU zohledňuje nejen přímý účinek látky na integritu membrán, ale poskytuje informace také o obecné toxicitě zkoušené látky, protože identifikuje narušení metabolických funkcí na různých buněčných úrovních. U žádného z oftalmologických přípravků zkoušených touto metodou však nebyla překročena hraniční hodnota NRU₅₀ pro stanovení potenciálu oční dráždivosti, tj. 10 000 µg/ml. Látky, jež dosahují hodnoty NRU₅₀ nad 10 000 µg/ml, jsou považovány za zcela necytotoxické a bez jakýchkoli negativních účinků na oči (Jones et al., 1999; Spielmann et al., 1996). Výsledky této studie potvrdily oprávněnost zvoleného predikčního modelu pro zkoušku cytotoxicity NRU.

Pro hodnocení potenciálu dráždivosti chemických látek pro oko je v posledních letech vyvíjena a ověřována řada metod in vitro založených na buněčných či organotypických modelech. Problémem při jejich validaci je nízká kvalita a nedostatek dat z Draizova testu na králících. U řady látek zcela chybí informace o účinku z humánní praxe. Proto byla provedena

studie oční dráždivosti zaměřená na chemické látky, u nichž byla známa kožní dráždivost stanovená metodami in vitro a in vivo (Jírová et al., 2008; 2010). Z výsledků vyplynulo, že některé látky dráždivé na kůži nemusí nutně vyvolávat oční iritaci. Těkavé nebo pevné látky mohou být rozdílně klasifikovány vzhledem ke svým fyzikálněchemickým vlastnostem a zásadním odlišnostem v postupu Draizovy zkoušky kožní a oční dráždivosti. Ve zkoušce kožní dráždivosti (metoda B.4) jsou látky aplikovány v množství 0,5 ml či 0,5 g na oholenou kůži králíků pod okluzivní náplastí po dobu 4 hod. Ve zkoušce oční dráždivosti (metoda B.5) je látka aplikována v množství 0,1 ml či 0,1 g do spojivkového vaku, poté se víčka na 1 min. přidrží, aby nedošlo k úniku vzorku (ES, 2008). Vzorky se nevyplachují, ale dochází k jejich postupnému odstranění slzením.

Chemická látka č.11, di-n-propyldisulfid, je klasifikována jako kožní iritant na králících, ale nebyla klasifikována jako dráždivá ani s použitím modelu EpiDermTM, ani ve skupině dobrovolníků (viz strana 70). Ve studii oční dráždivosti di-n-propyldisulfid vyvolal pozitivní reakce pouze ve zkoušce HET-CAM, ostatní in vitro metody, EpiOcularTM a NRR, jej klasifikovaly jako nedráždivý. Dle databáze referenčních látek pro oční iritaci (ECETOC, 1998) je di-n-propyldisulfid klasifikován na základě Draizova testu na třech králících jako nedráždivý, ale vyvolal u všech pokusných zvířat slabé podráždění spojivky, které vymizelo do 2 dnů od aplikace. Tento výsledek potvrzuje důležitost zkoušky HET-CAM, která simuluje podráždění spojivky a je tak důležitým doplňkem ostatních in vitro metod zohledňujících především potenciální poškození rohovkového epitelu.

Příkladem vysoce těkavé látky je látka č. 9, 1-bromhexan, který vyvolává kožní dráždivost pouze při aplikaci v okluzi (jak na králících, tak ve skupině dobrovolníků) či při prodloužené aplikaci na modelu EpiDermTM. Klasifikace oční dráždivosti in vivo na králících není bohužel známa, ale ve studii in vitro byla tato látka hodnocena jako nedráždivá ve zkouškách NRR a EpiOcularTM a vyvolala jen slabé dráždivé účinky ve zkoušce HET-CAM.

Pevné látky č. 19 a 20, kyseliny naftalenoctová a dodekanová, dle údajů z databáze ECETOC (1998) klasifikované jako silně dráždivé až leptavé (R41), způsobily u pokusných zvířat závažné poškození rohovky přetrvávající u některých zvířat více než 21 dní. Zaznamenané podráždění spojivky bylo téměř zanedbatelné. Vzhledem k tomu, že se jedná o pevné látky ve formě ve vodě nerozpustných krystalů, je možné, že způsobily poškrábání rohovky u pokusných králíků. Tyto látky ve studii in vitro vedly pravděpodobně i k mechanickému poškození tkání EpiOcularTM, nenavodily však skutečné chemické poškození, jak dokumentují negativní výsledky zkoušek NRR a HET-CAM. V tomto případě klasifikace oční iritace na králících nemusí odpovídat relevantním expozičním podmínkám u člověka,

kde lze očekávat okamžité odstranění těchto látek důkladným výplachem nebo intenzivním slzením.

Statistické hodnocení výsledků studie na 20 chemických látkách ukázalo, že výsledky metody HET-CAM se významně shodují se zkouškou cytotoxicity NRR (75,0% shody, $\kappa=0,4681$, $p=0,0067$). EpiOcularTM, model lidské rohovky, poskytuje významně shodné výsledky se zkouškou cytotoxicity NRR (70,0 % shody, $\kappa=0,3939$, $p=0,391$), ale shoda se zkouškou HET-CAM je velmi nízká (55,0% shody, $\kappa=0,0426$, $p=0,4111$). Toto zjištění potvrzuje, že každá z těchto zkoušek poskytuje informaci o poškození jiného typu oční tkáně a že všechny mají své místo ve strategii postupného zkoušení chemických látek (McNamee et al., 2009).

Výsledky studie na tenzidových kosmetických prostředcích ukázaly, že zkouška na modelu EpiOcularTM správně identifikovala přípravek č.2, Šampon proti lupům s pyrithionem zinečnatým na mastné vlasy, jako přípravek s nejvyšším potenciálem oční iritace, neboť již obsah aktivních ingrediencí indikuje signifikantní schopnost potenciálně navodit oční dráždivost. Podobné výsledky byly zaznamenány i ve zkouškách NRR a NRU. Zkouška HET-CAM naopak správně identifikovala přípravek s nejmírnějšími dráždivými účinky pro oční tkáně vzhledem k nízkému obsahu tenzidů (č.1, Dětský šampon). Receptury dvou přípravků, č.1 (Dětský šampon) a č.5 (Ekologické tekuté mýdlo), byly výrobcem navrženy s ohledem na jemnou dětskou pokožku, resp. na životní prostředí, a jsou i vysoce šetrné ke tkáním oka. Ve všech zkouškách in vitro bylo u těchto vzorků dosaženo výsledků dokumentujících nejnižší stupeň lokální toxicity a tím byl potvrzen předpoklad pro optimální snášenlivost při použití v humánní praxi. Statistické hodnocení výsledků studie na kosmetických prostředcích prokázalo významné korelace mezi metodami NRR/EpiOcularTM a NRU/EpiOcularTM, potvrzující důležitost využití těchto in vitro metod pro predikci poškození epitelia rohovky. Všechny použité alternativní zkoušky jsou úspěšně řadu let využívány jako screeningové metody pro hodnocení potenciálu oční dráždivosti při vývoji tenzidových kosmetických prostředků, kdy jsou srovnávány s referenčním standardním výrobkem ("benchmark") se známými účinky in vivo (Jones et al., 2001).

Studie oční iritace různých typů substancí odhalila, že zkouška cytotoxicity NRR může vést k falešně negativním výsledkům v případě látek s fixačním účinkem, který zabrání úniku NR z buněk, nebo u látek, které absorbují NR a nejsou zcela odstraněny jednorázovým oplachem dle standardního protokolu. Řešením by mohla být optimalizace oplachu (větší objem PBS nebo opakovaný oplach). Především u formulací s vysokou viskozitou je opakovaný oplach naprosto nezbytný. Jako zásadní krok pro zajištění správné klasifikace se

jeví mikroskopické hodnocení buněčné kultury ihned po oplachu zkoušené látky. Tato doporučení pro modifikaci protokolu INVITTOX č.54 se objevila i v závěrečné zprávě panelu oponentů ("Peer Review Panel") při retrospektivní validaci čtyř *in vitro* metod pro hodnocení oční dráždivosti, kterou zorganizoval ECVAM v roce 2009. Metoda NRR nebyla Vědeckým výborem ECVAM zatím doporučena jako samostatná metoda pro plnohodnotnou náhradu testu na zvířatech vzhledem k nedostatkům v parametrech reprodukovatelnosti, transferability a oblasti použití této zkoušky (ECVAM, 2009).

Zkouška HET-CAM, využívající bohatě prokrvenou chorioalantoidní membránu, poskytuje významné výsledky ve vztahu k poškození spojivky. Přestože nadhodnocuje dráždivé účinky zkoušených látek, patří k metodám s nejnižší mírou falešné negativity (Gettings et al., 1994; 1996) a je s oblibou využívána k průkazu nepřítomnosti potenciálu oční dráždivosti u kosmetických prostředků. Při použití standardního systému bodování dle Kalweitova vzorce, založeného na odečtu doby vzniku hemoragie, koagulace a lýzy, může docházet k tomu, že jeden dominantní účinek překryje ostatní parametry. Paradoxně tak může dojít ke vzniku vyššího iritačního skóre u nižších koncentrací téže látky (viz 3% SLS oproti 20% SLS, Tabulka č. 15). Pokud není možné hodnocení všech tří parametrů najednou, pak by mohl být dráždivý účinek látky lépe vyjádřen pomocí maximálního skóre dominantního účinku.

Každá z použitých metod pro stanovení oční iritace *in vitro* poskytuje dílčí informaci o mechanismu účinku zkoušené látky na specifické tkáň oka. Všechny použité zkoušky prokázaly dobrou reprodukovatelnost výsledků, ale zároveň je nutno zdůraznit, že bez dostatečného množství referenčních údajů ze zkoušek *in vivo* je obtížné stanovit predikční schopnost jednotlivých alternativních metod.

V současné době zůstává jedinou předepsanou standardní metodou pro hodnocení oční dráždivosti Draizův test na králících podle Nařízení Komise (ES) č.440/2008, Metoda B.5 (ES, 2008a). Jak stanoví příloha této zkoušky oční dráždivosti, při hodnocení dráždivých účinků na oči je nutné shromáždit všechny relevantní údaje o účincích zkoušené látky a látek s analogickou chemickou strukturou (QSAR - Quantitative structure-activity relationship). Data je třeba hodnotit s využitím postupů založených na průkaznosti důkazů ("weight of evidence"). Zvláštní důraz je kladen na posouzení veškerých dostupných údajů o účincích látky na člověka a zvířata, jejích fyzikálněchemických vlastností a dále na posouzení výsledků zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*.

Úplné nahrazení zkoušky oční dráždivosti na zvířatech je jednou z priorit center pro validaci alternativních metod v Evropě i USA (ECVAM, ICCVAM). V posledních letech

proběhla řada validačních studií, vycházejících ze systematické kompilace existujících údajů z Draizova testu i z humánní praxe a jejich porování s výsledky metod in vitro (Balls et al., 1999, ICCVAM, 2007). Výsledky ukázaly, že jednotlivé in vitro metody obecně byly navrženy tak, že simulují mechanismus účinku látek na specifické oční tkáně, což vede k nutnosti nahradit Draizův test oční dráždivosti baterií vzájemně se doplňujících alternativních metod. V budoucnu je proto nutné vytvořit databázi referenčních standardních chemikálií, identifikovat omezení a oblast použití jednotlivých alternativních metod, po zhodnocení výsledků oční iritace dostatečného množství chemických látek různých tříd vytvořit relevantní predikční modely a sestavit baterii metod pokrývajících všechny mechanismy účinku na jednotlivé druhy oční tkáně (Worth a Balls, 2002). Teprve úspěšná validace jednotlivých alternativních metod může vést k legislativnímu zapracování baterie zkoušek a jejich využití při klasifikaci hodnocení rizika chemických látek. (Scott et al., 2010).

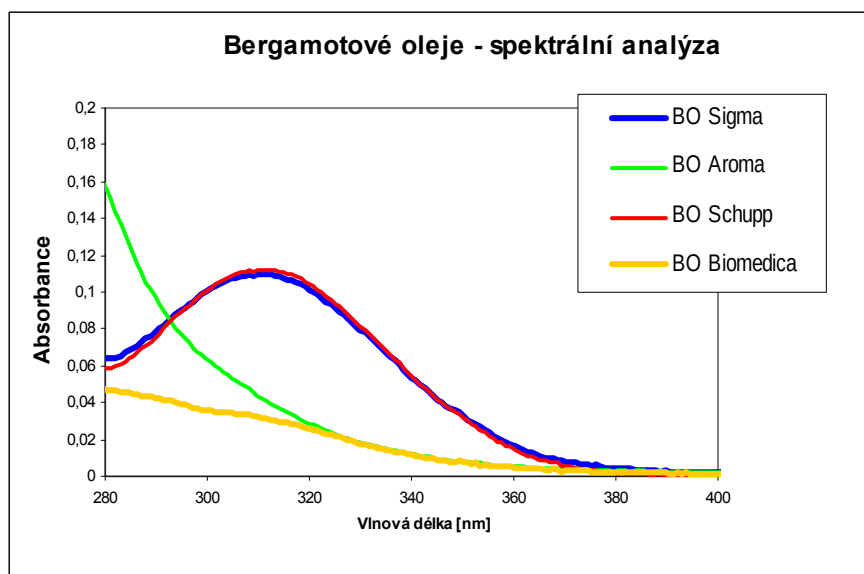
2.3.3. Biologické účinky záření

2.3.3.1. Fototoxicita bergamotových olejů

Cílem této studie bylo nejen identifikovat možné rozdíly ve fototoxicitě bergamotových olejů od různých výrobců s odlišným obsahem fotoaktivních látek, ale také zhodnotit potenciál fototoxicity v závislosti na použitých rozpouštědlech, doporučených v oficiální metodologii zkoušek fototoxicity (Spielmann et al., 2000; ES, 2008c). Čtyři komerčně dostupné vzorky bergamotového oleje (BO AROMA, BO BIOMEDICA, BO SIGMA a BO SCHUPP) byly podrobeny spektrální a chemické analýze za účelem identifikace obsahu fotoaktivních komponent. Fototoxicita byla stanovena metodami in vitro s použitím validované zkoušky fototoxicity 3T3 NRU PT (ES, 2008c) a zkoušky fototoxicity na modelu rekonstruované lidské kůže EpiDermTM (Liebsch et al., 1999). Na základě výsledků na modelu EpiDermTM byla poté provedena limitovaná studie fototoxicity in vivo ve skupině lidských dobrovolníků, zaměřená na ověření možné extrapolace výsledků in vitro na situaci v humánní praxi.

2.3.3.1.1. Výsledky

Spektrofotometrická analýza v oblasti UV/vis prokázala vyšší absorbanci (v rozsahu 300 – 360 nm) v případě BO SCHUPP a BO SIGMA, ve srovnání se vzorky BO AROMA a BO BIOMEDICA (obr. 23).



Obr. 23: Spektrální analýza bergamotových olejů

Chemická analýza s využitím plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) umožnila identifikaci a kvantifikaci známých fotoaktivních látek v jednotlivých vzorcích bergamotových olejů. V tabulce č.17 jsou uvedeny hmotnostní koncentrace (v %) jednotlivých identifikovaných složek. U vzorků BO AROMA a BO BIOMEDICA nebyla identifikována přítomnost sledovaných fotoaktivních složek. Zvýšený obsah fotoaktivních látek byl zjištěn u vzorků BO SIGMA a BO SCHUPP. Mimo bergaptenu byly identifikovány jeho deriváty bergaptol a bergamotin a také další potenciálně fotoaktivní látky, jako je citropten, isopimpinelin, geranial a neral.

Název BO (výrobce)	Neral	Geranial	Bergapt en	Bergapt ol	Bergamoti n	Isopimpi -nelin	Citropte n
AROMA	-	-	-	-	-	-	-
BIOMEDICA	-	-	-	-	-	-	-
SIGMA	0,48	0,04	0,13	0,3	0,86	<0,01	0,13
SCHUPP	0,43	-	0,18	<0,01	0,83	-	0,19

Tab. 17: Obsah fotoaktivních látek ve vzorcích bergamotových olejů

S použitím zkoušky fototoxicity 3T3 NRU PT ve dvou nezávislých pokusech byly ze čtyř zkoušených vzorků bergamotových olejů dva klasifikovány jako nefototoxické a dva jako fototoxické. Výsledky vyjádřené pomocí fotoiritačního faktoru (PIF) nebo středního světelného účinku (MPE) jsou shrnuty v tabulce č. 18. U některých vzorků však výsledky byly nejednoznačné nebo byla klasifikace provedena na základě hraničních hodnot PIF a MPE. Navíc se ukázalo, že výsledky této zkoušky byly závislé na použitém rozpouštědle (PBS, DMSO nebo ethanol).

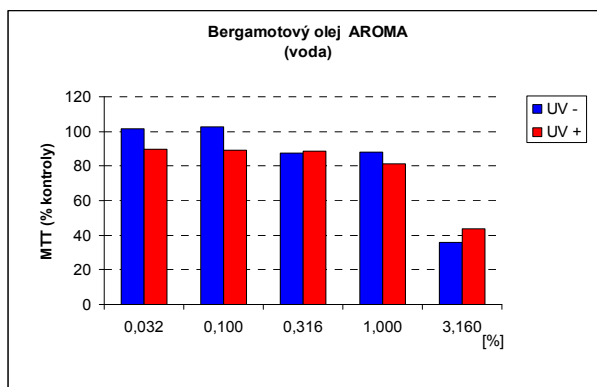
Bergamotový olej	Rozpouštědlo	Pokus č.	PIF	MPE
AROMA	Ethanol (1% v PBS)	1	1,218	0,027
		2	1,067	-0,004
	DMSO (1% v PBS)	1	1,006	0,005
		2	1,185	-0,038
	PBS	1	1,075	0,004
		2	0,905	0,064
BIOMEDICA	Ethanol (1% v PBS)	1	1,377	-0,004
		2	1,178	0,016
	DMSO (1% v PBS)	1	1,051	0,003
		2	0,904	-0,017
	PBS	1	1,310	0,113*
		2	1,113	0,031
SIGMA	Ethanol (1% in PBS)	1	1,159	0,000
		2	1,383	0,147*
	DMSO (1% in PBS)	1	1,266	0,048
		2	1,666	0,144*
	PBS	1	1,648	0,017
		2	2,380*	0,232**
SCHUPP	Ethanol (1% v PBS)	1	1,126	0,126*
		2	1,358	0,156**
	DMSO (1% v PBS)	1	1,419	0,081
		2	1,410	0,088
	PBS	1	2,581*	0,289**
		2	3,415*	0,348**

* pravděpodobně fototoxický, ** fototoxický

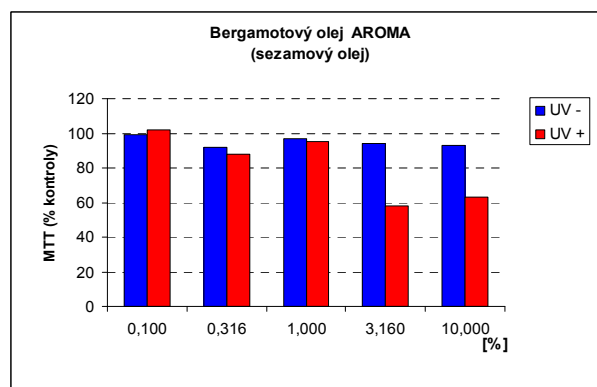
Tab. 18: Fototoxicita bergamotových olejů - 3T3 NRU PT

Zkouška fototoxicity s využitím modelu EpiDermTM prokázala potenciál fototoxicity u BO AROMA v oleji a BO SIGMA a BO SCHUPP ve vodě i v oleji (obr. 24a - 24h). Fototoxicita nebyla zjištěna u BO AROMA ve vodě a u BO BIOMEDICA ve vodě ani v oleji.

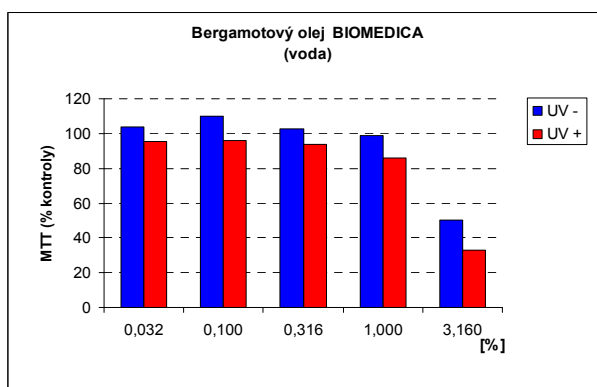
a) BO AROMA ve vodě



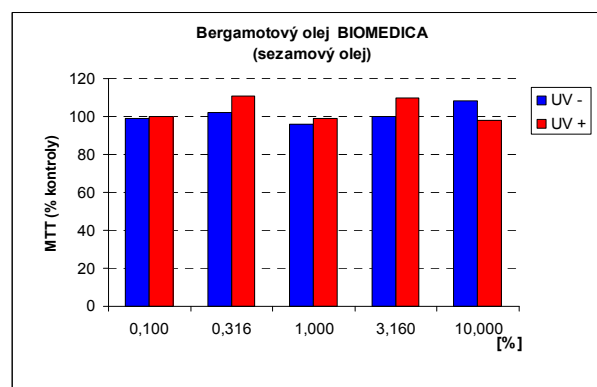
b) BO AROMA v oleji



c) BO BIOMEDICA ve vodě

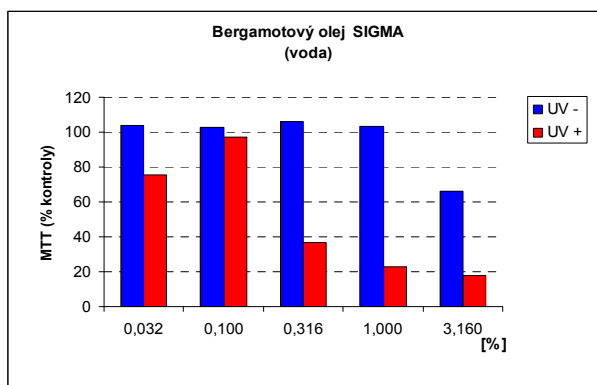


d) BO BIOMEDICA v oleji

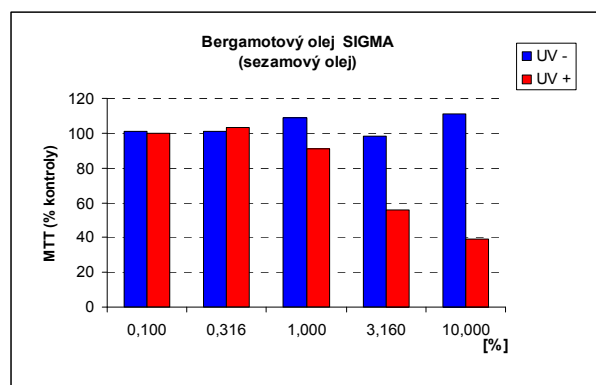


Obr. 24a-d: Fototoxicita BO AROMA a BO BIOMEDICA s využitím modelu EpiDermTM. Každý sloupec znázorňuje průměrnou životnost dvou tkání bez ozáření (UV-) a s ozářením (UV+).

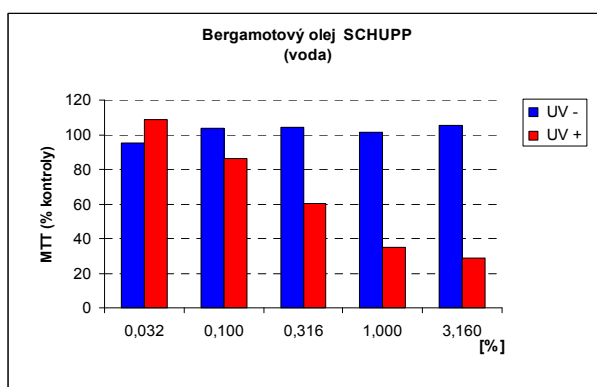
e) BO SIGMA ve vodě



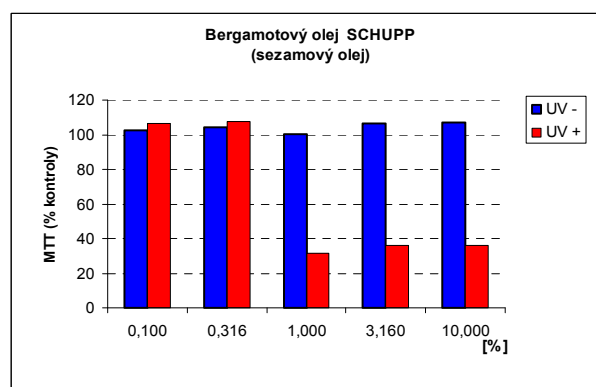
f) BO SIGMA v oleji



g) BO SCHUPP ve vodě



h) BO SCHUPP v oleji



Obr. 24e-h: Fototoxicita BO SIGMA a BO SCHUPP s využitím modelu EpidermTM. Každý sloupec znázorňuje průměrnou životnost dvou tkání bez ozáření (UV-) a s ozářením (UV+).

Následující zkouška fototoxicity in vivo v limitované skupině dobrovolníků (5 subjektů) byla založena na aplikaci nejvyšší nefototoxické/necytotoxické koncentrace jednotlivých olejů zjištěných ve zkoušce na modelu EpiDermTM. Vzorčky byly ředěny ve vodě a sezamovém oleji. Počet pozitivních reakcí byl odečítán ve třech časových intervalech po aplikaci a následném ozáření.

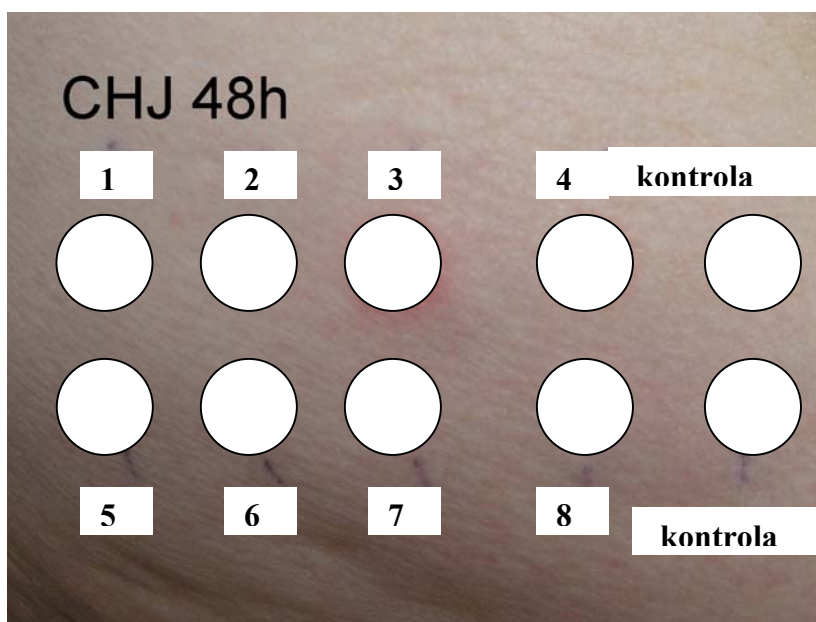
Fototoxické účinky in vivo ve formě erytému či pigmentace byly pozorovány pouze v případě vzorků BO SIGMA a BO SCHUPP ředěných vodou. Vzorčky ředěné v oleji nevyvolaly žádnou pozitivní reakci. Výsledky zkoušky fototoxicity in vivo jsou shrnuty v tabulce č. 19.

Bergamotový olej	počet pozitivních reakcí v různých intervalech odečtu		
	24 h	48 h	72 h
AROMA (1% ve vodě)	0/5	0/5	0/5
BIOMEDICA (1% ve vodě)	0/5	0/5	0/5
SIGMA (0,1% ve vodě)	5/5	5/5	5/5
SCHUPP (0,0316% ve vodě)	5/5	5/5	5/5
AROMA (1% v oleji)	0/5	0/5	0/5
BIOMEDICA (10% v oleji)	0/5	0/5	0/5
SIGMA (0,316% v oleji)	0/5	0/5	0/5
SCHUPP (0,1% v oleji)	0/5	0/5	0/5

Tab. 19: Fototoxicita bergamotových olejů - epikutánní test ve skupině dobrovolníků

Časná erytémová reakce po ozáření vzorků BO SIGMA a BO SCHUPP, ředěných vodou, se vyvinula do 24 hod po aplikaci vzorků a následném ozáření. Nejsilnější projevy fotoirritace byly zaznamenány 72 hod po ozáření. BO SIGMA (0,1% ve vodě) vyvolal mírný až silný erytém, doprovázený edémem, u všech 5 subjektů. BO SCHUPP (0,0316% ve vodě)

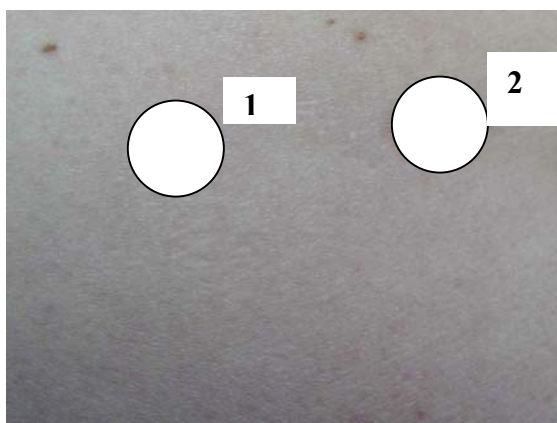
navodil velmi slabý až mírný erytém bez edému. Obrázek č. 25 znázorňuje příklad kožní reakce jednoho z dobrovolníků 48 hod po ozáření.



1 - BO AROMA (1% ve vodě); 2 - BO BIOMEDICA (1% ve vodě); 3 - BO SIGMA (0,1% ve vodě);
 4 - BO SCHUPP (0,0316% ve vodě); 5 - BO AROMA (1% v oleji); 6 - BO BIOMEDICA (10% v oleji);
 7 - BO SIGMA (0,316% v oleji); 8 - BO SCHUPP (0,1% v oleji)

Obr. 25: Fototoxicita bergamotových olejů - příklad kožní reakce 48 hod po ozáření

Erytémová reakce se postupně u všech dobrovolníků během 7 dní vyvinula v persistentní pigmentaci připomínající opálení. Na obrázku č. 26 je vidět hyperpigmentace přetrvávající až 30 dní po provedení epikutánního testu.



1 - BO SIGMA (0,1% ve vodě); 2 - BO SCHUPP (0,0316% ve vodě)

Obr. 26: Fototoxicita bergamotových olejů - příklad hyperpigmentace přetrvávající 30 dní po ozáření

2.3.3.1.2. Diskuse

Z literatury je známo, že některé chemické látky klasifikované jako fototoxické ve zkoušce 3T3 NRU PT nejsou fototoxické, pokud jsou aplikovány na kůži v nízkých koncentracích (Jones et al, 2003; Kandarova, 2006). Tento jev je spojován s jejich omezenou biologickou dostupností v kůži, související s jejich nízkou či žádnou penetrací/absorpcí. Předpokládá se, že biologická dostupnost fotoaktivní látky je klíčovým faktorem pro rozvoj kožní reakce po ozáření (Jones et al., 2003; Liebsch et al., 2005). Rekonstruované modely lidské kůže obsahují rohovou vrstvu a tudíž vykazují bariérovou funkci obdobnou jako lidská epidermis. Proto jsou navrženy jako doplňková metoda pro verifikaci pozitivních výsledků ze zkoušky 3T3 NRU PT a pro zkoušení látek, které nelze v buněčné kultuře testovat, např. z důvodu nerozpustnosti ve vodném prostředí. Modely rekonstruované lidské kůže umožňují zkoušení přípravků a látek, aplikovaných topicky, bez ředění, s extrémním pH či zapracované ve formulacích v nízkých koncentracích jako v konečném spotřebitelském výrobku (Liebsch et al., 2005).

Známostou podmínkou fototoxického účinku látky je její schopnost absorpce světelné energie v oblasti slunečního záření (ES, 2008c). Tato studie prokázala, že fototoxický potenciál čtyř bergamotových olejů byl závislý na jejich absorpci UVA a obsahu fotoaktivních komponent.

Chromatografická analýza složení BO AROMA a BO BIOMEDICA neodhalila přítomnost žádného ze známých fototoxických furokumarinů v těchto vzorcích. Vzorek BO BIOMEDICA neprokázal prakticky žádnou absorpci v kritické oblasti UV záření (300 – 400 nm) a v žádné ze zkoušek fototoxicity in vitro ani in vivo nenavodil fototoxické účinky. Podobné výsledky byly získány i v případě BO AROMA, pouze nejvyšší koncentrace použité ve zkoušce na modelu EpiDermTM (3,16% a 10% v sezamovém oleji) způsobily fototoxickou reakci. Tento výsledek mohl být způsoben přítomností neidentifikovaných nečistot v BO AROMA, což indikuje i výkyv v absorpčním spektru kolem 280-290 nm (viz obr. 23).

BO SIGMA a BO SCHUPP prokázaly výraznou absorpci záření v oblasti 300-340 nm, indikující potenciál pro fotoaktivaci. Chemická analýza ukázala přítomnost řady fotoaktivních komponent v jejich složení, včetně bergaptenu. Fototoxické účinky těchto vzorků byly potvrzeny zkouškami in vitro na buňkách i kožních modelech v závislosti na použitém rozpouštědle. Při použití vodných roztoků (PBS v případě zkoušky 3T3 NRU PT) byly tyto oleje v obou systémech klasifikovány jako fototoxické. Obecně lze konstatovat, že použití dalších doporučených rozpouštědel ve zkoušce 3T3 NRU PT, jako je ethanol a DMSO, nepřispělo ke zlepšení klasifikace, protože vedlo k nejednoznačným nebo hraničním

hodnotám PIF a MPE. Použití DMSO jakožto rozpouštědla může naopak snížit fototoxický účinek zkoušené látky vzhledem k tomu, že se projevuje jako lapač volných radikálů (Masaki et al., 1995). Na základě výsledků této studie lze doporučit, aby i omezeně rozpustné látky jako éterické oleje byly přednostně zkoušeny ve vodném roztoku, používaném často i v humánní praxi, aby nedocházelo k chybné negativní klasifikaci.

V dermatologické studii zahrnující omezený počet lidských dobrovolníků byly aplikovány koncentrace bergamotových olejů, které se projevíly jako nefototoxické a necytotoxické ve zkoušce in vitro na modelu lidské kůže EpiDermTM. V případě vodných roztoků BO SIGMA a BO SCHUPP byly in vivo u lidí navozeny fototoxické kožní reakce i při použití nefototoxických koncentrací zjištěných in vitro. Výběr koncentrací pro klinickou studii byl založen na znalosti vyšší permeability modelu lidské kůže oproti lidské kůži in vivo (Perkins et al., 1996; Ponc et al., 2001), byla proto předpokládána nižší biologická dostupnost v lidské kůži vzhledem k její lepší bariérové funkci. Nejvyšší nefototoxické koncentrace bergamotových olejů in vitro ředěných v sezamovém oleji dobře korelovaly s výsledky zkoušky na lidských dobrovolnících, zatímco koncentrace ředěné ve vodě vyvolaly větší kožní reakci in vivo, než bylo očekáváno. Vyšší reaktivita lidské kůže in vivo může být vysvětlena relativně vyššími dávkami UVB záření emitovanými solárním simulátorem, které jsou v pokusech in vitro eliminovány. Při zkouškách in vitro jsou buňky či tkáň ozařovány s použitím víčka mikrotitační destičky, která má zvýšený filtrační účinek pro UVB záření (Liebsch a Spielmann, 1998).

24 hod po ozáření byl na kůži subjektů exponované BO SIGMA a BO SCHUPP ve vodě pozorován erytém, který se po 72 hod vyvinul v pigmentaci připomínající nadměrné opálení kůže. Tento jev je způsoben přítomností bergaptenu, o němž je známo, že stimuluje melanogenezi a tím prohlubuje ztmavnutí kůže při opalování. V minulosti byl bergamotový olej záměrně přidáván do prostředků ke slunění, ale vzhledem k novým poznatkům o možných fotogenotoxických a fotokarcinogenních vlastnostech bergaptenu se od této praxe upouští (Moysan et al., 1993). Pigmentační účinek chemických látek nelze zkoušet na modelu lidské kůže EpiDermTM, protože tento model neobsahuje melanocyty. Hodnocení změn pigmentace by bylo možné provádět v modifikované zkoušce fototoxicity s využitím specifických modelů kůže obsahujících aktivní melanocyty, jako je např. MelanoDermTM od firmy MatTek.

Tato studie na bergamotových olejích nepotvrdila vyšší citlivost modelu lidské kůže ve srovnání s lidskou kůží in vivo. Nebyla zjištěna přímá korelace výsledků zkoušek in vitro s bezpečnou koncentrací pro lidskou kůži. Zkouška fototoxicity s využitím modelu lidské kůže

je důležitým nástrojem pro potvrzení přítomnosti či absence fototoxického potenciálu látek. Nemůže však být využita pro přímou predikci koncentrace pro bezpečné použití v humánní praxi, aniž je zařazen další bezpečnostní faktor, a to minimálně 10, tj. užití 10x nižší koncentrace než je nejvyšší nefototoxická koncentrace ve zkoušce na kožním modelu in vitro.

2.3.3.2. Fototoxicita dalších éterických olejů

Cílem této studie, navazující na předchozí pokusy se čtyřmi bergamotovými oleji (Kejlová et al., 2007), bylo hodnocení potenciálu fototoxicity u skupiny komerčně dostupných éterických olejů, které jsou součástí mnoha spotřebních výrobků, jako jsou antiseptické přípravky, prostředky pro domácnost, aromata a kosmetické prostředky. Pro zkoušení byly vybrány citrusové éterické oleje (pomeranč, citron, mandarinka a grapefruit) a silice Litsea cubeba. V této studii byla opět využita strategie postupného zkoušení zahrnující spektrální a chemickou analýzu vzorků (GC/MS), in vitro zkoušky fototoxicity (3T3 NRU PT a zkouška fototoxicity na modelu lidské kůže EpiDermTM) a zkoušku fototoxicity in vivo ve skupině lidských dobrovolníků. Sada 31 éterických olejů dostupných na trhu, zakoupených od sedmi různých dodavatelů, byla chemicky analyzována a jejich fototoxický potenciál byl stanoven metodou 3T3 NRU PT. Následně byly zkoušeny i vzorky finálních výrobků (glycerinových mýdel), v jejichž receptuře byly zapracovány éterické oleje firmy SALUS ze stejné šarže. Vybrané vzorky 8 olejů z pomeranče, citronu a Litsea cubeba byly poté testovány metodou s využitím kožních modelů. Na základě výsledků na modelu EpiDermTM byla provedena limitovaná studie fototoxicity in vivo ve skupině lidských dobrovolníků, zaměřená na ověření možnosti extrapolace výsledků in vitro na situaci v humánní praxi.

2.3.3.2.1. Výsledky

U všech zkoušených vzorků spektrofotometrická analýza v oblasti UV/vis prokázala absorbanci v rozsahu 300 - 350 nm, indikující potenciál fotoaktivace a případných fototoxických účinků.

Výsledky chemické analýzy zkoušených vzorků éterických olejů metodou GC/MS, zaměřené na identifikaci známých fotoaktivních komponent éterických olejů (viz kapitola 2.2.2.3.) jsou uvedeny v tabulkách č. 20-24. Obsah jednotlivých složek je vyjádřen jako hmotnostní koncentrace v %.

Název (výrobce)	Neral	Geranial	Bergapten	Citropten
Pomeranč AROMA	0,101	0,270		
Pomeranč BIOMEDICA	0,100	0,280		<0,01
Pomeranč hořký BIOMEDICA	0,020	0,075	0,137	
Pomeranč EONÉ	0,115	0,293		
Pomeranč Karl Hadek	0,078	0,254		
Pomeranč extra Karl Hadek	0,102	0,336		
Pomeranč bez terpenů Karl Hadek	0,447	0,875		
Pomeranč Nobilis Tilia	0,070	0,140		
Pomeranč hořký Nobilis Tilia	<0,01	0,050	<0,01	
Pomeranč SALUS	0,020	0,063		

Tab. 20: Obsah fotoaktivních složek v pomerančových olejích

Název (výrobce)	Neral	Geranial	Oxypeucedanin	Citropten	Herniarin
Citron AROMA	1,796	4,060		<0,01	<0,01
Citron BIOMEDICA	2,217	4,416			
Citron EONÉ	1,945	3,236	<0,01	0,052	<0,01
Citron Karl Hadek	1,823	3,047	<0,01	0,080	<0,01
Citron extra Karl Hadek		2,884	0,020	0,094	<0,01
Citron bez terpenů Karl Hadek	14,449	21,738	0,063	0,105	
Citron Nobilis Tilia	2,125	3,686	<0,01	<0,01	<0,01

Tab. 21: Obsah fotoaktivních složek v citronových olejích

Název (výrobce)	Neral	Geranial	Bergapten	Bergaptol
Grapefruit BIOMEDICA	0,217	0,612		<0,01
Grapefruit EONÉ	<0,01	0,054		<0,01
Grapefruit Karl Hadek	0,059	0,141		0,020
Grapefruit Nobilis Tilia	0,085	0,181		<0,01
Grapefruit SALUS	0,070	0,098	<0,01	0,040

Tab. 22: Obsah fotoaktivních složek v grapefruitových olejích

Název (výrobce)	Neral	Geranial
Mandarinka AROMA	<0,01	<0,01
Mandarinka BIOMEDICA	0,356	0,722
Mandarinka EONÉ		
Mandarinka Karl Hadek		
Mandarinka Nobilis Tilia	<0,01	

Tab. 23: Obsah fotoaktivních složek v mandarinkových olejích

Název (výrobce)	Neral	Geranial
Litsea cubeba AROMA	21,837	30,775
Litsea cubeba BIOMEDICA	29,689	39,962
Litsea cubeba Nobilis Tilia	32,061	41,177
Litsea cubeba SALUS	32,476	40,983

Tab. 24: Obsah fotoaktivních složek v olejích Litsea cubeba

Téměř všechny analyzované citrusové oleje obsahovaly neral a geranial v různém množství. V grapefruitových olejích se mimo neralu/geranialu vyskytoval i bergaptol,

v jednom případě i bergapten. V citronových silicích byl identifikován také oxypeucedanin, herniarin a citropten. Mandarinkové silice obsahovaly malé množství neralu/geranialu a u některých nebyly identifikovány žádné známé fotoaktivní látky. Oleje Litsea cubeba se skládaly z 50-70% z neralu/geranialu a neobsahovaly žádné další známé fotoaktivní komponenty. Dle předpokladu deterpenované (koncentrované) oleje Pomeranč bez terpenů Karl Hadek a Citron bez terpenů Karl Hadek obsahovaly ostatní složky, tj. neral/geranial, nebo oxypeucedanin v případě citronové silice, ve vyšším množství oproti neupravenému vzorku.

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU s použitím jednoho rozpouštědla (PBS) byla provedena u všech testovaných vzorků. Výsledky vyjádřené pomocí fotoiritačního faktoru (PIF) nebo středního světelného účinku (MPE) jsou shrnuty v tabulkách č. 25-29.

Název (výrobce)	Pokus	PIF	MPE
Pomeranč AROMA	1	1,282	0,024
	2	5,093**	0,139*
Pomeranč EONĚ	1	2,715*	0,233**
	2	2,033*	0,050
Pomeranč BIOMEDICA	1	1,507	0,091
	2	1,667	0,062
Pomeranč hořký BIOMEDICA	1	1,841	0,199**
	2	1,929	0,143*
Pomeranč Karl Hadek	1	1,987	0,166**
	2	2,395*	0,072
Pomeranč extra Karl Hadek	1	2,340*	0,206**
	2	1,703	0,169**
Pomeranč bez terpenů Karl Hadek	1	2,552*	0,161**
	2	1,866	0,184**
Pomeranč Nobilis Tilia	1	1,901	0,233**
	2	1,318	0,120*
Pomeranč hořký Nobilis Tilia	1	1,505	0,086
	2	2,349*	0,240**
Pomeranč SALUS	1	1,188	0,102
	2	1,289	0,107*

*** pravděpodobně fototoxický, ** fototoxický**

Tab. 25: Fototoxicita pomerančových olejů - 3T3 NRU PT

Název (výrobce)	Pokus	PIF	MPE
Citron AROMA	1	2,105*	0,149*
	2	1,808	0,218**
Citron BIOMEDICA	1	10,010**	0,510**
	2	6,158**	0,279**
Citron EONÉ	1	3,427*	0,259**
	2	1,734	0,221**
Citron Karl Hadek	1	1,352	0,036
	2	1,274	0,093
Citron extra Karl Hadek	1	1,370	0,045
	2	1,063	0,001
Citron bez terpenů Karl Hadek	1	2,630*	0,268**
	2	4,952*	0,376**
Citron Nobilis Tilia	1	1,208	0,081
	2	1,974	0,080

* pravděpodobně fototoxický, ** fototoxický

Tab. 26: Fototoxicita citronových olejů - 3T3 NRU PT

Název (výrobce)	Pokus	PIF	MPE
Grapefruit BIOMEDICA	1	1,651	0,181**
	2	1,313	0,055
Grapefruit EONÉ	1	1,551	0,113*
	2	1,368	0,082
Grapefruit Karl Hadek	1	1,477	0,102*
	2	1,366	0,103*
Grapefruit Nobilis Tilia	1	1,861	0,091
	2	1,310	0,080
Grapefruit SALUS	1	2,028*	0,288**
	2	1,510	0,175**

* pravděpodobně fototoxický, ** fototoxický

Tab. 27: Fototoxicita grapefruitových olejů - 3T3 NRU PT

Název (výrobce)	Pokus	PIF	MPE
Mandarinka AROMA	1	1,836	0,093
	2	1,707	0,108*
Mandarinka BIOMEDICA	1	13,656**	0,515**
	2	2,619*	0,265**
Mandarinka EONÉ	1	1,466	0,063
	2	1,360	0,015
Mandarinka Karl Hadek	1	1,627	0,098
	2	1,338	0,055
Mandarinka Nobilis Tilia	1	1,460	0,029
	2	1,288	0,014

* pravděpodobně fototoxický, ** fototoxický

Tab. 28: Fototoxicita mandarinkových olejů - 3T3 NRU PT

Název (výrobce)	Pokus	PIF	MPE
Litsea cubeba AROMA	1	8,442**	0,112*
	2	9,702**	0,212**
Litsea cubeba BIOMEDICA	1	18,211**	0,396**
	2	5,559**	0,091
Litsea cubeba Nobilis Tilia	1	1,529	0,009
	2	1,913	0,081
Litsea cubeba SALUS	1	4,024*	0,151**
	2	4,369*	0,201**

* pravděpodobně fototoxický, ** fototoxický

Tab. 29: Fototoxicita olejů Litsea cubeba - 3T3 NRU PT

Většina éterických olejů byla fototoxická či pravděpodobně fototoxická. Některé oleje, např. Pomeranč BIOMEDICA nebo Litsea cubeba Nobilis Tilia, fototoxické účinky vůbec nenavodily, přestože měly obdobné složení jako fototoxické vzorky stejného druhu oleje. Nejméně fototoxické byly mandarinkové oleje s výjimkou Mandarinky BIOMEDICA s vyšším obsahem neralu a geranialu.

Ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU PT byly zkoušeny také finální kosmetické výrobky (glycerinová mýdla) se známým obsahem éterických olejů firmy SALUS stejné šarže (viz strana 58). Obsah silic ve výrobcích a výsledky zkoušky fototoxicity jsou uvedeny v tabulce č. 30.

Název	obsah silic	PIF	MPE
<i>Litsea</i>	Litsea cubeba 0,18%	1,275	0,018
<i>Grapefruit</i>	Citrus paradisi 0,31%	1,219	0,093
<i>Pomeranč</i>	Citrus sinensis 0,26%	1,238	-0,014
<i>Vánoční pohoda</i>	Citrus sinensis 0,044% Litsea cubeba 0,03%	1,015	0,000

Tab. 30: Zkouška fototoxicity glycerinových mýdel - 3T3 NRU PT

Zatímco éterické oleje Litsea cubeba SALUS a Grapefruit SALUS ve zkoušce 3T3 NRU PT byly významně fototoxické, mýdla s nízkým obsahem těchto fototoxických éterických olejů (v rozsahu 0,03% až 0,31%) nevyvolala v této zkoušce fototoxické účinky.

Na základě složení a prvních výsledků fototoxicity bylo vybráno 8 vzorků silic s různým potenciálem fototoxicity pro detailnější zkoumání jejich fototoxických účinků. Zkouška fototoxicity 3T3 NRU PT byla u těchto vzorků provedena i s použitím dalších doporučených rozpouštědel, tj. ethanolu a DMSO (tabulka č. 31).

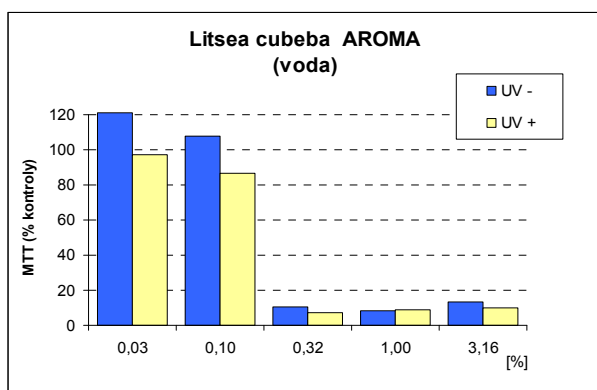
Název (výrobce)	Rozpouštědlo	Pokus	PIF	MPE
Litsea cubeba AROMA	Ethanol (1% v PBS)	1	5,513**	0,024
		2	5,442**	0,110
	DMSO (1% v PBS)	1	4,179*	0,166**
		2	2,191*	-0,172
	PBS	1	8,442**	0,112*
		2	9,702**	0,212**
Litsea cubeba BIOMEDICA	Ethanol (1% v PBS)	1	18,329**	0,512**
		2	3,021*	0,093
	DMSO (1% v PBS)	1	18,268**	0,342**
		2	6,590**	0,178**
	PBS	1	18,211**	0,396**
		2	5,559**	0,091
Pomeranč AROMA	Ethanol (1% v PBS)	1	1,044	0,025
		2	1,056	0,014
	DMSO (1% v PBS)	1	1,071	-0,003
		2	1,117	0,077
	PBS	1	1,282	0,024
		2	5,093**	0,139*
Pomeranč EONÉ	Ethanol (1% v PBS)	1	1,462	0,014
		2	0,981	-0,009
	DMSO (1% v PBS)	1	1,724	0,074
		2	0,930	0,002
	PBS	1	2,715*	0,233**
		2	2,033*	0,050
Pomeranč bez terpenů Karl Hadek	Ethanol (1% v PBS)	1	1,343	-0,073
		2	1,333	0,101*
	DMSO (1% v PBS)	1	1,609	0,037
		2	1,307	0,033
	PBS	1	2,552*	0,161**
		2	1,866	0,184**
Citron AROMA	Ethanol (1% v PBS)	1	1,380	0,082
		2	1,202	0,008
	DMSO (1% v PBS)	1	1,099	0,004
		2	0,965	-0,023
	PBS	1	2,105*	0,149*
		2	> 1,808*	0,218**
Citron EONÉ	Ethanol (1% v PBS)	1	1,037	0,035
		2	1,225	0,085
	DMSO (1% v PBS)	1	1,253	0,010
		2	1,437	0,175**
	PBS	1	3,427*	0,259**
		2	1,734	0,221**
Citron bez terpenů Karl Hadek	Ethanol (1% v PBS)	1	2,072*	0,115*
		2	1,935	0,204**
	DMSO (1% v PBS)	1	1,690	0,156**
		2	1,564	0,142*
	PBS	1	2,630*	0,268**
		2	4,952*	0,376**

* pravděpodobně fototoxický, ** fototoxický, > nebyla dosažena koncentrace IC50 (-UV)
Tab. 31: Fototoxicita éterických olejů - 3T3 NRU PT (všechna rozpouštědla)

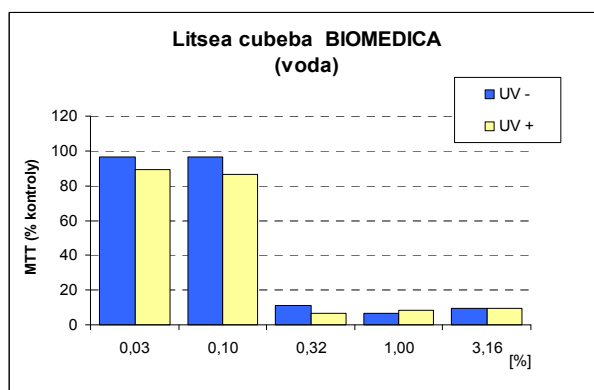
Ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU byly všechny vybrané silice klasifikovány jako fototoxické či pravděpodobně fototoxické, i když v některých případech se jednalo o nejednoznačné nebo hraniční výsledky. U vzorků Litsea cubeba AROMA a BIOMEDICA byl prokázán vysoký potenciál fototoxicity při použití všech tří doporučených rozpouštědel. Naopak u vzorků Pomeranč AROMA, Pomeranč EONÉ a Citron AROMA byl fototoxický účinek navozen pouze při aplikaci vzorků v PBS. U ostatních vzorků byly výsledky při použití ethanolu a DMSO jako rozpouštědel nejednoznačné.

Ve zkoušce fototoxicity s využitím rekonstruovaného kožního modelu EpidermTM byly vybrané vzorky zkoušeny ve vodném roztoku v rozmezí koncentrací 0,03% - 3,16%. U vzorků Litsea cubeba AROMA a BIOMEDICA byl pozorován silný cytotoxický účinek, ale v použitém rozmezí koncentrací nebyl navozen fototoxický účinek, tj. ani v jedné koncentraci po ozáření nebyla životnost tkání snížena nejméně o 30% oproti životnosti tkáně exponované stejné koncentraci, ale bez ozáření. Ostatní éterické oleje vykazovaly potenciál fototoxicity v souladu s výsledky zkoušky 3T3 NRU PT (obr. 27a - 27h).

a) Litsea cubeba AROMA

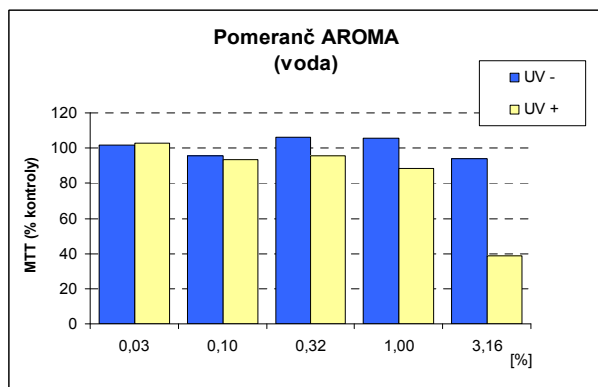


b) Litsea cubeba BIOMEDICA

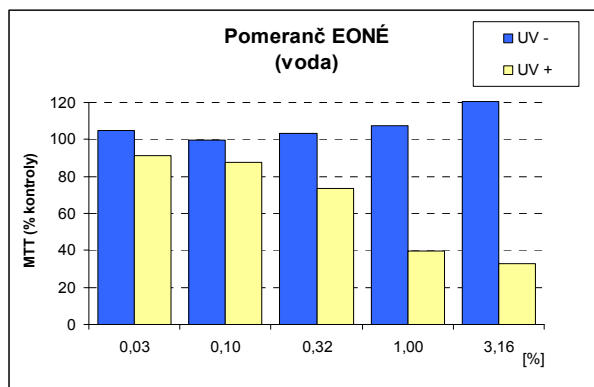


Obr. 27a-b: Fototoxicita éterických olejů s využitím modelu EpidermTM. Každý sloupec znázorňuje průměrnou životnost dvou tkání bez ozáření (UV-) a s ozářením (UV+).

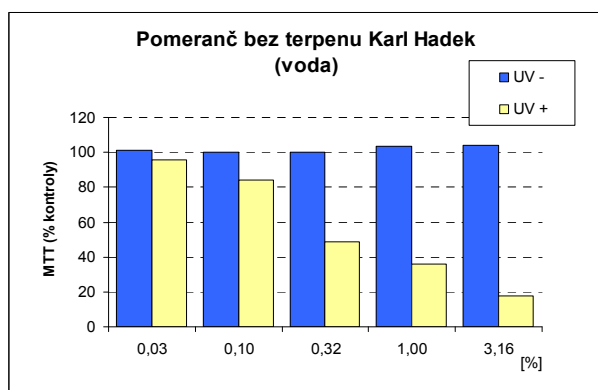
c) Pomeranč AROMA



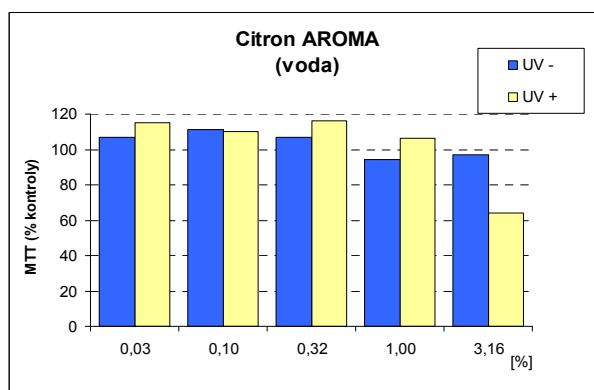
d) Pomeranč EONÉ



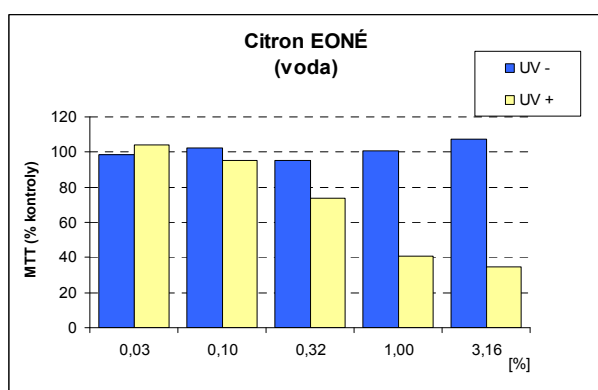
e) Pomeranč bez terpenů Karl Hadek



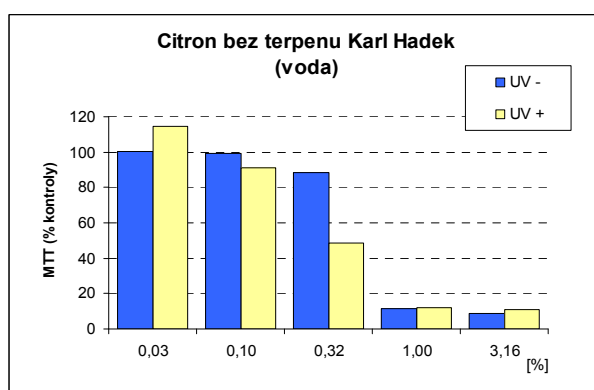
f) Citron AROMA



g) Citron EONÉ



h) Citron bez terpenů Karl Hadek



Obr. 27c-h: Fototoxická účinnost éterických olejů s využitím modelu Epiderm™. Každý sloupec znázorňuje průměrnou životnost dvou tkání bez ozáření (UV-) a s ozářením (UV+).

V epikutánním testu fototoxicity in vivo ve skupině dobrovolníků byly použity nejvyšší necytotoxické/nefototoxické koncentrace ze zkoušky in vitro na modelu EpiDermTM a koncentrace 10x nižší, tzn. byl zařazen bezpečnostní faktor 10. Všechny vzorky byly ředěny destilovanou vodou. Zvýšený výskyt kožních reakcí ve formě velmi slabého erytému či pigmentace byl zaznamenán po aplikaci a ozáření vzorků Pomeranče AROMA, Citronu AROMA, Citronu EONÉ a Citronu bez terpenů Karl Hadek v koncentracích, které byly necytotoxické/nefototoxické ve zkoušce in vitro. U některých subjektů se navíc objevily i dráždivé reakce ve formě velmi slabého erytému u kontrolních vzorků bez ozáření UVA. Pokud byli dobrovolníci exponováni 10x nižšími koncentracemi těchto vzorků, nebyly pozorovány žádné kožní reakce (tabulka č. 32).

Éterický olej (ředěný vodou)	počet pozitivních reakcí v různých intervalech odečtu		
	24 h	48 h	72 h
Litsea cubeba AROMA (0,1%)	0/10	0/10	0/10
Litsea cubeba AROMA (0,01%)	0/10	0/10	0/10
Litsea cubeba BIOMEDICA (0,1%)	0/10	0/10	0/10
Litsea cubeba BIOMEDICA (0,01%)	0/10	0/10	0/10
Pomeranč AROMA (1%)	6/10 dráždí 3/10	6/10 dráždí 3/10	4/10 dráždí 3/10
Pomeranč AROMA (0,1%)	0/10	0/10	0/10
Pomeranč EONÉ (0,1%)	1/10	0/10	0/10
Pomeranč EONÉ (0,01%)	0/10	0/10	0/10
Pomeranč bez terpenů Karl Hadek (0,1%)	0/10	0/10	1/10
Pomeranč bez terpenů Karl Hadek (0,01%)	0/10	0/10	0/10
Citron AROMA (1%)	6/10 dráždí 5/10	5/10 dráždí 3/10	5/10 dráždí 3/10
Citron AROMA (0,1%)	0/10	0/10	0/10
Citron EONÉ (0,1%)	2/10 dráždí 1/10	3/10	2/10
Citron EONÉ (0,01%)	0/10	0/10	0/10
Citron bez terpenů Karl Hadek (0,1%)	1/10 dráždí 1/10	6/10	5/10
Citron bez terpenů Karl Hadek (0,01%)	0/10	0/10	0/10

Tab. 32: Fototoxicita éterických olejů - epikutánní test fototoxicity ve skupině dobrovolníků

2.3.3.2.1. Diskuse

Výsledky této studie potvrdily potenciál fototoxicity u řady éterických olejů používaných jako ingredience kosmetických prostředků, výrobků pro domácnost či aromaterapeutických přípravků. Výrobci kosmetických prostředků jsou si vědomi rizika

fototoxických účinků těchto éterických olejů a proto Mezinárodní asociace výrobců fragrancí (International Fragrance Association – IFRA) vydala doporučení týkající se maximálního obsahu silic v různých výrobcích. Např. obsah pomerančové silice (*Citrus aurantium*) ve výrobcích aplikovaných na pokožku exponovanou slunci nesmí přesáhnout 1,25%, aby se omezilo nebezpečí fototoxicity nebo fotokarcinogeneze (IFRA, 2002). Obsah grapefruitového oleje je omezen na 4%, citronového oleje na 2% a citralu na 0,04% - 2,5% podle typu výrobku a míry expozice organismu (IFRA, 2008). Obsah těchto látek ve výrobcích, které se oplachují, není nijak omezen. V této studii byly zkoumány fototoxické účinky éterických olejů SALUS po zpracování do finálního výrobku. Výrobce na etiketu glycerinových mýdel pravděpodobně na principu předběžné opatrnosti přidal varování: "může vyvolat fotosenzibilitu". Zkouška 3T3 NRU PT však prokázala, že tyto finální výrobky s nízkým obsahem silic již nemají potenciál vyvolat fototoxické účinky. Tyto výsledky potvrdily, že riziko fototoxických účinků glycerinových mýdel s nízkým obsahem fototoxických silic je zanedbatelné.

Výsledky této studie prokázaly, že fototoxicita éterických olejů je podmíněna obsahem fotoaktivních složek, především furokumarinů. Fototoxický účinek byl nejjednoznačněji navozen u silic s nejvyšším obsahem fotoaktivních látek. Zkoušení vzorků s nižším obsahem fotoaktivních komponent vedlo k nekonzistentním či hraničním hodnotám PIF a MPE. Fototoxický účinek je však pravděpodobně navozen i dalšími dosud nepopsanými fotoaktivními látkami, protože u některých vzorků obsahujících vysoký podíl neralu a geranialu (např. *Litsea cubeba* Nobilis *Tilia*) fototoxický účinek proti očekávání zaznamenán nebyl. Opět se projevil význam použití vhodného rozpouštědla - fototoxický účinek byl pozorován především u vzorků ředěných PBS (obdobně jako ve studii na bergamotových olejích, viz kapitola 2.3.3.1.). Na základě výsledků této studie lze doporučit při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU použití všech doporučených rozpouštědel, aby se zabránilo případné chybné klasifikaci (Kejlová et al., 2007).

Tato studie potvrdila, že některé substance klasifikované jako fototoxické ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU, jediné validované a právně závazné metodě v současné době, nemusí vyvolat fototoxické účinky na lidské kůži in vivo (Jones et al., 2003, Kandárová et al., 2007). Monolayer myších fibroblastů 3T3 Balb/c představuje zjednodušený model ve srovnání s trojrozměrnou strukturou lidské kůže a postrádá bariérové funkce rohové vrstvy. Nepostihuje proto biologickou dostupnost zkoušené látky aplikované topicky na kůži. Metoda založená na rekonstruovaných kožních modelech, obsahujících funkční stratum corneum,

zohledňuje stupeň absorpce/penetrace látky a z ní vyplývající biologickou dostupnost v hlubších vrstvách kůže (Spielmann et al., 2000).

S využitím obou in vitro metod byly vodné roztoky 8 vybraných éterických olejů shodně klasifikovány jako fototoxické s výjimkou olejů *Litsea cubeba*, kde fototoxický účinek v použitých koncentracích na modelu kůže EpiDermTM nebyl zaznamenán. Nepřítomnost očekávaného fototoxického potenciálu ve zkoušce na kožním modelu oproti zkoušce 3T3 NRU mohla být způsobena vysoce cytotoxickým účinkem v rozsahu použitých koncentrací. Tento cytotoxický účinek mohl překrýt účinek fototoxický, a proto je nezbytné další zkoušení v užším rozmezí koncentrací mezi 0,1% a 3,16%.

V epikutánním testu fototoxicity in vivo ve skupině dobrovolníků byly použity nejvyšší necytotoxické/nefototoxické koncentrace ze zkoušky in vitro na modelu EpiDermTM a koncentrace 10x nižší. U řady subjektů byly zaznamenány dráždivé reakce po aplikaci některých vzorků v koncentracích, které byly necytotoxické/nefototoxické ve zkoušce in vitro, a to i bez ozáření. Protokol zkoušky fototoxicity s využitím modelu EpiDermTM je zcela odlišný od protokolu zkoušky kožní dráždivosti EpiDermTM SIT (viz bod 2.2.3.3.), a proto nelze využít k predikci kožní dráždivosti u lidí. Výskyt fototoxických reakcí ve formě erytému či pigmentace in vivo po aplikaci a ozáření vzorků v koncentracích, jež byly nefototoxické ve zkoušce využívající rekonstruovanou lidskou epidermis, je v souladu s výsledky studie na bergamotových olejích (viz kapitola 2.3.3.1.). Opět se nepotvrdila vyšší citlivost kožních modelů oproti lidské kůži in vivo, která je citována v odborné literatuře (Ponec et al., 2001; 2002). Pokud byl zařazen bezpečnostní faktor 10 a dobrovolníci byli exponováni 10x nižším koncentracím těchto fototoxických vzorků, nebyly pozorovány žádné kožní reakce.

Zkouška fototoxicity s využitím trojrozměrných kožních modelů je užitečným doplňkem pro potvrzení klasifikace látek jak z hlediska jejich fototoxického potenciálu, identifikovaného zkouškou na buněčném modelu 3T3 NRU, tak z důvodů nalezení bezpečné koncentrace pro topickou aplikaci. V humánní praxi však nelze použít přímo koncentrace klasifikované jako bezpečné na kožním modelu, protože v některých případech mohou být zaznamenány nežádoucí kožní reakce. Pokud zkouška fototoxicity 3T3 NRU PT vede k hraničním nebo nejednoznačným výsledkům, měla by látka být zkoumána pomocí zkoušky fototoxicity na trojrozměrných modelech lidské kůže a výsledky ověřeny v klinické studii s použitím bezpečnostního faktoru 10 za účelem hodnocení rizika dané látky před zapracováním do spotřebních výrobků pro humánní praxi.

2.3.3.3. Fototoxická UV filtrů

Ve spolupráci s Výzkumným ústavem organických syntéz, a.s., byl řešen projekt dotovaný MPO s názvem "Fotoprotektivní pracovní prostředky" (FT-TA3/050), zaměřený na vývoj nových typů UV absorbérů. Během 3 let byly navrženy, syntetizovány a zkoumány UV filtry rozpustné v oleji, ve vodě i zcela nerozpustné, aplikovatelné ve formě disperze. Tyto sloučeniny pak byly podrobeny celé škále toxikologických zkoušek, v první řadě zkoušce fototoxicity in vitro 3T3 NRU PT, a dále u vybraných vzorků zkoušce fototoxicity a kožní dráždivosti s využitím modelu lidské epidermis EpiDermTM (viz kapitola 2.3.1.2).

2.3.3.3.1. Výsledky

U všech nových sloučenin, syntetizovaných v laboratoři VÚOS (viz strana 58), byla jako první stupeň hodnocení bezpečnosti prováděna screeningová zkouška fototoxicity 3T3 NRU PT in vitro. Výsledky všech pokusů jsou shrnuty v tabulce č. 33.

Většina zkoušených nových látek vykazovala velmi nízkou cytotoxicitu, nebyly cytotoxické do nejvyšší testované koncentrace (1000 µg/ml), proto ve většině případů nebylo možné vypočítat hodnotu IC₅₀ bez přítomnosti záření. Pokud existovala hodnota IC₅₀ v přítomnosti záření IC₅₀(+UV), byl z dosažených hodnot spočítán ">PIF", kdy za IC₅₀(-UV) byla dosazena nejvyšší zkoušená koncentrace látky. Pro hodnoty ">PIF" platí, že hodnota ">PIF" > 1 ukazuje na potenciál fototoxicity. Většina ze zkoušených UV absorbérů s výjimkou Cosolu E vykazovala potenciál fototoxicity. V některých případech byly výsledky nejednoznačné či hraniční (např. Soltex E279, Soltex E311, Soltex 7M a Soltex 8M).

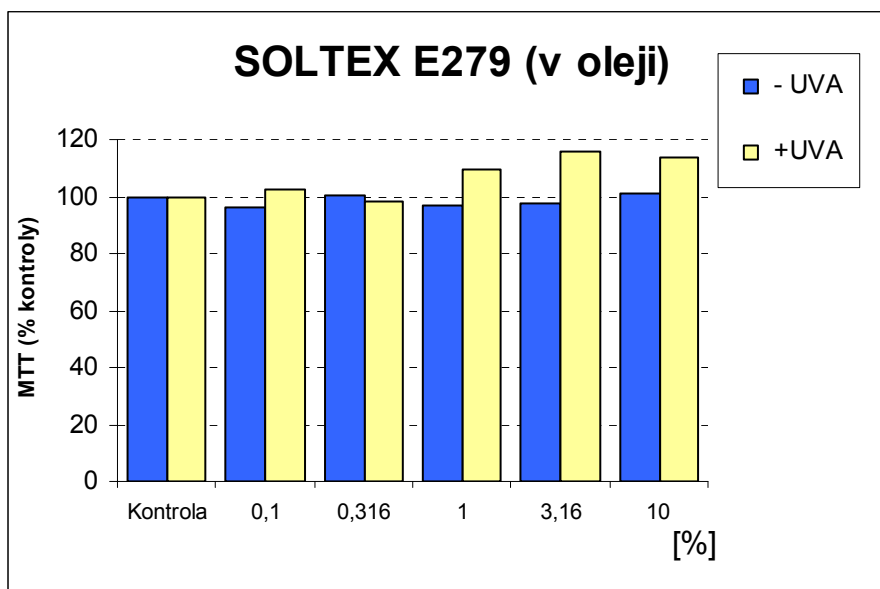
Název	Rozpouštědlo	Pokus	PIF	MPE
Soltex E279	ethanol	1	2,300*	0,131*
		2	2,259*	0,112*
Soltex E311	PBS	1	>1,000	-0,070
		2	>1,149*	0,152**
		3	>1,000	0,022
Cosol E	DMSO	1	>1,000	0,100
		2	>1,000	-0,028
		3	>1,000	-0,014
Cosol E disperze 80 nm	PBS	1	1,082	0,001
		2	1,568	0,008
Cosol E disperze 200 nm	PBS	1	1,405	-0,044
		2	1,734	0,029
Soltex M	DMSO	1	>3,020**	0,355**
		2	>5,350**	0,382**
		3	>20,000**	0,558**
Soltex MN	DMSO	1	>3482,17**	0,894**
		2	>141,6**	0,700**
Soltex 2M	DMSO	1	>13,5**	0,183**
		2	>9,365**	0,265**

Soltex 3M	DMSO	1	>16,536**	0,387**
		2	>41,651**	0,518**
Soltex 4M	DMSO	1	366,017**	0,795**
		2	16,800**	0,370**
Soltex 5M	DMSO	1	266,778**	0,656**
		2	38,475**	0,457**
Soltex 6M	DMSO	1	8,547**	0,655**
		2	>44,921**	0,541**
Soltex 7M	DMSO	1	>5,385**	0,052
		2	>1,308*	0,039
Soltex 8M	DMSO	1	>1,042*	0,114*
		2	>1,000	0,115*
Soltex S	PBS	1	>83,700**	0,595**
		2	>5,648**	0,258**
		3	>45,321**	0,644**

* pravděpodobně fototoxický, ** fototoxický
> nebyla dosažena koncentrace IC₅₀ (-UV)

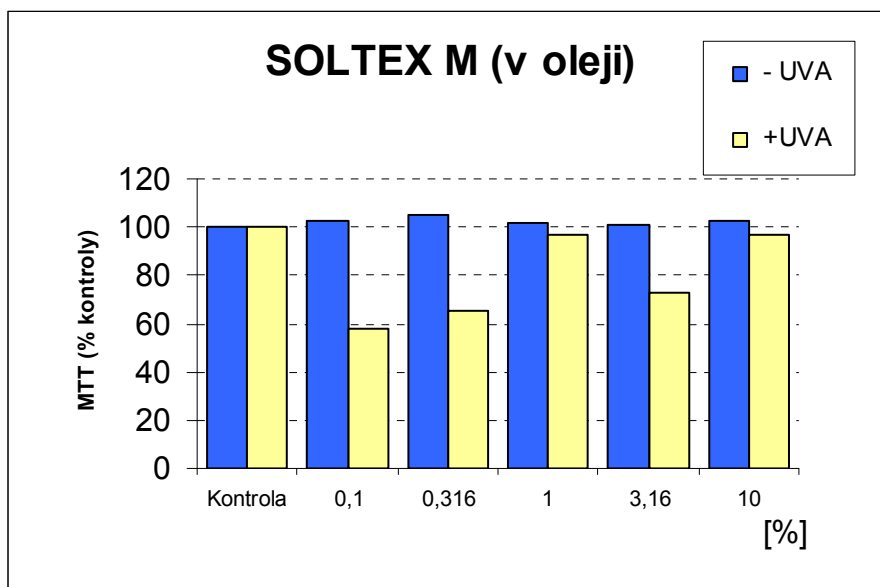
Tab. 33: Fototoxicita UV absorbérů - 3T3 NRU PT

Lipofilní UV filtr Soltex E279 vykazoval ve zkoušce 3T3 NRU PT pravděpodobně fototoxické účinky na základě hraničních hodnot PIF a MPE, proto byl podroben další zkoušce fototoxicity s využitím rekonstruovaného modelu kůže EpiDermTM. Tato zkouška nepotvrdila potenciál fototoxicity této látky, pokud byla použita v maximální koncentraci 10%. V žádné z testovaných koncentrací nedošlo po ozáření k poklesu životnosti o více než 30% (obr. 28).



Obr. 28: Fototoxicita Soltexu E279 s použitím modelu EpiDermTM. Každý sloupec znázorňuje průměrnou životnost dvou tkání bez ozáření (-UVA) a s ozářením (+UVA).

Další ve vodě nerozpustný filtr Soltex M vykazoval nejen ve zkoušce 3T3 NRU PT, ale i s použitím modelu EpiDermTM fototoxické účinky (obr. 29). Ve vyšších koncentracích nad 1% se uplatnil filtrační účinek této molekuly, záření neproniklo ke kožním tkáním, a proto nebyl navozen fototoxický účinek. Ten se projevil jednoznačně v nižších koncentracích, kde pokrytí tkání absorbérem nebylo tak významné.



Obr. 29: Fototoxicita Soltexu M s využitím modelu EpiDermTM. Každý sloupec znázorňuje průměrnou životnost dvou tkání bez ozáření (-UVA) a s ozářením (+UVA).

2.3.1.2.2. Diskuse

Vývoj nových UV filtrů je spojen se zkoušením bezpečnosti těchto nových chemických látek, které nesmí mít žádné negativní účinky stejně jako jiné ingredience spotřebních výrobků. Používání UV filtrů do kosmetických prostředků je v zemích Evropského společenství regulováno. Evropská směrnice pro kosmetické prostředky povoluje v současné době použití 28 látek jako UV filtrů (Příloha č.7 k vyhlášce č. 448/2009 Sb., o stanovení hygienických požadavků na kosmetické prostředky). Látky uvedené na seznamu povolených UV filtrů jsou předmětem aplikace přísných toxikologických kritérií a vyhodnocení bezpečnosti (SCCNFP, 2003).

V rámci projektu MPO "Fotoprotektivní pracovní prostředky" byly nově syntetizované UV filtry zkoušeny přednostně screeningovými in vitro metodami, aby se zabránilo zbytečnému vývoji a optimalizaci toxikologicky nevhodných chemických struktur. Na základě výsledků zkoušek fototoxicity s využitím metod in vitro byla v průběhu projektu celá řada nových sloučenin buď modifikována, nebo vyřazena z dalšího testování.

Lipofilní UV filtr nazvaný Soltex E279 vykazoval ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU PT pravděpodobný potenciál fototoxicity, který však nebyl potvrzen ve zkoušce fototoxicity s využitím modelu EpiDermTM. Vzhledem k tomu, že zkouška 3T3 NRU PT je v současné době jedinou validovanou a právně závaznou zkouškou fototoxicity, byla provedena modifikace molekuly Soltexu E279 s cílem omezit její fototoxické vlastnosti. Výsledný UV filtr Soltex E311 však nebyl fotostabilní a jeho výsledky fototoxicity byly nejednoznačné, a proto tato část výzkumu byla ukončena.

Z organických, ve vodě nerozpustných filtrů byl zkoušen kopolymer E-esteru s deriváty kyseliny akrylové pod názvem Cosol E, který nevykazoval potenciál fototoxicity ani ve formě suroviny, ani po namletí a zapracování do vodné disperze. Tento UV filtr neprokázal ani potenciál kožní dráždivosti ve zkoušce využívající model EpiDermTM (viz kapitola 2.3.1.2), a proto mohl být dále testován v celé baterii toxikologických zkoušek v Centru ekologie, toxikologie a analytiky v rámci VÚOS, a.s., Rybitví.

Další organický UV sbsorbér připravený kondenzací benzimidazolanilinu a kyanurchloridu, označený Soltex M, vykazoval ve zkouškách fototoxicity významný potenciál fototoxických účinků. Byl proto strukturně modifikován a optimalizován tak, aby byly zachovány jeho absorpční vlastnosti a eliminován fototoxický potenciál. Výsledky zkoušky fototoxicity 3T3 NRU PT modifikovaných verzí Soltexu M (tj. Soltex MN, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 8M) ukázaly, že se nepodařilo najít molekulu bez potenciálu fototoxicity, a proto se tento směr výzkumu také uzavřel.

Výše uvedené výzkumné práce vyústily v návrh nového UV filtru. Pod pracovním názvem Cosol E byl zabudován do vysoce účinných, fotostabilních, širokopásmových fotoprotektivních prostředků, které byly podrobeny rozsáhlému dalšímu testování. Bylo zjištěno, že přípravek není fototoxický, je z toxikologického hlediska zcela nezávadný, nemá tendenci penetrovat kůži a ve směsi s UVB a UVA filtrem vykazuje synergické fotoprotektivní účinky v celém spektru dopadajícím na zemský povrch. Je možno jej použít pro přípravu emulzí jak s nízkými, tak s vysokými ochrannými faktory a ve srovnání s anorganickými UV filtry nezpůsobuje zbělení kůže (Kubáč et al., 2008). Postup syntézy a způsob použití Cosolu E je chráněn českou patentovou přihláškou číslo 2008-438, „Vodná mikrodisperze UV filtru na bázi methakrylátového kopolymeru, způsob její přípravy, a kosmetický fotoprotektivní prostředek obsahující tuto vodnou mikrodisperzi“ (VÚOS, 2009).

2.4. Závěr

V posledních letech jsou v Evropě z etických, finančních i vědeckých důvodů nahrazovány experimenty na zvířatech alternativními metodami *in vitro*, využívajícími buněčné a tkáňové kultury. Použití alternativních toxikologických metod namísto testů na zvířatech je povinné, pokud existuje validovaná nebo vědecky vyhovující metoda. Protokoly nových toxikologických metod *in vitro* musí být vyvinuty a optimalizovány tak, aby vedly k výsledkům srovnatelným či lepším, než poskytují právně závazné referenční metody.

Vzhledem k nedostatku kvalitních dat o kožní dráždivosti *in vivo* byla realizována v rámci této práce klinická studie zaměřená na hodnocení dráždivosti vybraných látek bez závažných toxikologických vlastností přímo na člověku. V limitované studii na 25 chemických látkách se projevila poměrně špatná konkordance mezi Draizovým testem na králících a kožní reakcí u lidí (přesnost pouze 56%). Optimalizovaná zkouška založená na kožním modelu EpiDermTM prokázala lepší konkordanci (přesnost 76%, resp. 68%) s výsledky klinické studie pravděpodobně proto, že rekonstruovaná lidská epidermis je svou strukturou bližší lidské kůži *in vivo* než kůže králíků. Potvrdilo se, že zkouška kožní dráždivosti ve skupině dobrovolníků 4HPT je důležitým zdrojem informací při klasifikaci hazardu chemických látek. Humánní data by měla být v budoucnosti využívána při vývoji a validaci alternativních metod, protože jen výsledky ověřené na lidech mohou poskytnout konečné rozhodnutí o predikční schopnosti alternativních metod. Výsledky této práce přispěly ke změnám v seznamu referenčních látek vydaných ECVAM i k modifikaci hodnocení charakteristik chování navrhovaných modelů rekonstruované lidské epidermis v návrhu metodického pokynu OECD.

Pro hodnocení oční dráždivosti chemických látek a směsí zůstává v současné době jedinou předepsanou standardní metodou Draizův test na králících. Jeho předpokladem je shromáždění všech relevantních údajů o účincích zkoušené látky a jejích strukturních obdob včetně dostupných údajů o účincích látky na člověka a zvířata, jejích fyzikálněchemických vlastností a výsledků zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Úplné nahrazení zkoušky oční dráždivosti na zvířatech je jednou z priorit center pro validaci alternativních metod v Evropě i USA, a proto v posledních letech proběhla řada validačních studií různých alternativních metod. Výsledky ukázaly, že Draizův test oční dráždivosti bude nutné nahradit baterií vzájemně se doplňujících metod *in vitro*. V budoucnu je proto nutné vytvořit databázi referenčních standardních chemikálií, identifikovat omezení a oblast použití jednotlivých alternativních metod, po zhodnocení výsledků oční iritace dostatečného množství chemických

látek různých tříd vytvořit relevantní predikční modely a sestavit baterii metod pokrývajících všechny mechanismy účinku. Tato práce, zaměřená na vybrané oftalmologické přípravky, chemické látky a kosmetické prostředky, přispěla k rozšíření databáze zkoušených substancí a odhalila limity jednotlivých zkoušek. Přispěla k diskusi o nutné modifikaci protokolu jednotlivých zkoušek a nutnosti vytvořit relevantní predikční modely pro hodnocení hazardu oční dráždivosti různých typů zkoušených substancí.

Pro zkoušení fototoxického potenciálu substancí byla již v roce 2000 validována alternativní zkouška využívající buněčnou kulturu fibroblastů 3T3 NRU PT. Je však známo, že některé chemické látky klasifikované jako fototoxické ve zkoušce 3T3 NRU PT in vitro nejsou fototoxické, pokud jsou aplikovány za přirozených podmínek in vivo na kůži člověka v nízkých koncentracích, a to díky jejich omezené penetraci a biologické dostupnosti v kůži. Proto jako doplňková metoda pro verifikaci fototoxických účinků byla navržena zkouška využívající rekonstruované modely lidské kůže, jež obsahují rohovou vrstvu a tudíž vykazují bariérovou funkci obdobnou jako lidská epidermis in vivo. Obě alternativní metody byly využity při hodnocení potenciálu fototoxicity bergamotových a jiných éterických olejů, používaných jako ingredience spotřebních výrobků. Tato studie potvrdila závislost potenciálu fototoxicity éterických olejů na obsahu fotoaktivních látek, jmenovitě furokumarinů. Bylo zjištěno, že výsledky fototoxicity ve zkoušce 3T3 NRU PT byly závislé na použitém rozpouštědle. Reprodukovatelné výsledky byly získány při použití vodného rozpouštědla (PBS), naopak použití dalších doporučených rozpouštědel, jako je ethanol a DMSO, nepřispělo ke zlepšení klasifikace, protože vedlo k nejednoznačným nebo hraničním výsledkům. Zkouška fototoxicity s využitím modelu lidské epidermis potvrdila, že některé substance klasifikované jako fototoxické ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU PT nemusí vyvolat fototoxické účinky na lidské kůži in vivo. V epikutánním testu fototoxicity ve skupině dobrovolníků byly použity nejvyšší necytotoxické/nefototoxické koncentrace ze zkoušky in vitro na modelu EpiDermTM a koncentrace 10x nižší. U řady subjektů byly zaznamenány pozitivní reakce po aplikaci některých vzorků v koncentracích, které byly necytotoxické/nefototoxické ve zkoušce in vitro. Nebyla potvrzena vyšší citlivost kožních modelů oproti lidské kůži in vivo, která je citována v odborné literatuře. Pokud byl zařazen bezpečnostní faktor 10 a dobrovolníci byli exponováni 10x nižším koncentracím těchto fototoxických vzorků, nebyly pozorovány žádné kožní reakce.

Studie fototoxicity ve skupině éterických olejů potvrdila, že zkouška fototoxicity s využitím trojrozměrných kožních modelů je užitečným doplňkem pro potvrzení klasifikace látek jak z hlediska jejich fototoxického potenciálu, identifikovaného zkouškou na buněčném

modelu 3T3 NRU, tak z důvodů nalezení bezpečné koncentrace pro topickou aplikaci. V humánní praxi však nelze použít přímo koncentrace klasifikované jako bezpečné na kožním modelu, protože v některých případech se mohou uplatnit i další faktory, např. metabolismus a interakce látek, které s využitím zjednodušeného modelu lidské epidermis nelze postihnout. Pokud zkouška fototoxicity 3T3 NRU PT vede k hraničním nebo nejednoznačným výsledkům, měla by látka být zkoumána pomocí zkoušky fototoxicity na trojrozměrných modelech lidské kůže a výsledky ověřeny v klinické studii s použitím bezpečnostního faktoru 10 za účelem hodnocení rizika dané látky před zapracováním do spotřebních výrobků pro humánní praxi.

Alternativní metody zkoušení fototoxicity jsou nedílnou součástí hodnocení bezpečnosti nových chemických látek včetně UV absorbérů, jež jsou před zařazením na seznam UV filtrů povolených v kosmetických prostředcích předmětem aplikace přísných toxikologických kritérií. V rámci projektu MPO "Fotoprotektivní pracovní prostředky" byly nově syntetizované UV filtry zkoušeny přednostně screeningovými in vitro metodami, aby se zabránilo zbytečnému vývoji a optimalizaci toxikologicky nevhodných chemických sloučenin. Na základě výsledků zkoušek fototoxicity s využitím metod in vitro byla v průběhu projektu celá řada nových sloučenin buď modifikována, nebo vyřazena z dalšího testování. Výsledkem tohoto projektu je návrh nového UV filtru, který byl zabudován do vysoce účinných, fotostabilních, širokopásmových fotoprotektivních prostředků. Cosol E není fototoxický, je z toxikologického hlediska zcela nezávadný a nemá tendenci penetrovat kůži. Postup syntézy a způsob použití Cosolu E je chráněn českou patentovou přihláškou.

Výsledky této práce potvrdily, že alternativní metody jsou vhodným nástrojem pro hodnocení bezpečnosti chemických látek a směsí. Při optimalizaci protokolu a standardizaci buněčného či tkáňového substrátu metody in vitro vedou k vysoce reprodukovatelným výsledkům, jež mohou predikovat situaci v humánní praxi lépe než konvenční metody na zvířatech. Provedené studie také ukázaly, jak zásadní význam má využití humánních dat při vývoji a validaci nových alternativních metod.

2.5. Souhrn

Snaha nahradit pokusy na zvířatech alternativními metodami in vitro vedla k vývoji a validaci řady metod založených na buněčných kulturách nebo rekonstruovaných modelech lidské tkáně. Tato práce byla zaměřena na zavedení a hodnocení metod in vitro pro zkoušení kožní/oční dráždivosti a fototoxicity.

Studie kožní dráždivosti 25 chemických látek, zkoušených s využitím modelu kůže EpiDermTM v optimalizovaném protokolu a ve skupině dobrovolníků (4HPT), odhalila, že modely tvořené lidskými buňkami mohou být užitečnější pro predikci hazardu kožní dráždivosti pro člověka než konvenční Draizova zkouška na králících. Shoda výsledků mezi zkouškou na zvířatech a 4HPT byla pouze 56%, zatímco shoda klasifikace s pomocí modelu EpiDermTM a ve skupině dobrovolníků dosáhla 76%. Tyto výsledky přispěly ke změnám v seznamu referenčních standardních látek, vydanému ECVAM, a byly zahrnuty do návrhu nového metodického pokynu OECD týkajícího se kožní dráždivosti.

Pomocí baterie metod byl hodnocen potenciál oční dráždivosti oftalmologických přípravků, kosmetických prostředků a chemických látek se známými údaji o jejich potenciálu kožní dráždivosti. Výsledky této studie přispěly ke specifikaci oblasti použití a omezení jednotlivých metod.

Tato práce zahrnovala také hodnocení fototoxických účinků bergamotových a jiných éterických olejů. Strategie postupného zkoušení se skládala z chemické analýzy, zkoušek fototoxicity in vitro 3T3 NRU PT a zkoušky na modelu lidské kůže EpiDermTM. Negativní výsledky nebo nejvyšší nefototoxické koncentrace získané s pomocí modelu kůže byly potvrzeny ve zkoušce fototoxicity ve skupině dobrovolníků. Fototoxicita éterických olejů byla závislá na obsahu fotoaktivních složek a na použitém rozpouštědle. Zkouška fototoxicity s využitím modelu lidské kůže je důležitým nástrojem pro volbu počátečních koncentrací použitých v konfirmačních testech na lidech, ale pro extrapolaci je nutné zařadit bezpečnostní faktor 10.

Zkoušky fototoxicity a kožní dráždivosti in vitro byly také použity při vývoji a syntéze nových UV filtrů a vedly ke vzniku nového, širokospektrálního UV absorbéru bez negativních účinků na zdraví.

Klíčová slova: oční dráždivost, kožní dráždivost, fototoxicita, buněčná kultura Balb/c 3T3, rekonstruovaný model EpiDermTM, EpiOcularTM, epikutánní test kožní dráždivosti, epikutánní test fototoxicity, chemické látky, éterické oleje, UV filtry, kosmetické prostředky

2.6. Summary

Efforts to replace animal experiments by alternative methods in vitro have led to the development and validation of various in vitro protocols, involving cell cultures or reconstructed human tissue models. This work was focused on implementation and evaluation of in vitro methods for testing skin and eye irritation and phototoxicity.

A study on skin irritation of 25 chemicals, using skin model EpiDerm™ with optimized protocol and 4h human patch test (4HPT) revealed, that in vitro models derived from human skin cells might be more useful for the prediction of human skin irritation hazard than conventional Draize test on rabbits. Concordance of the rabbit test with the 4HPT was only 56%, whereas concordance of human epidermis model EpiDerm™ with human data was 76%. These results contributed to amendments of the list of reference standard chemicals issued by ECVAM and included in draft OECD Test Guideline on skin irritation.

Eye irritation of ophthalmologic preparations, cosmetic products and chemicals with known skin irritation potential was assessed using a battery of in vitro methods. The results of this study contributed to the specification of applicability domain and revealed limitations of individual methods.

This work included evaluation of phototoxicity potential of bergamot and other essential oils. The applied tiered testing strategy involved chemical analysis, in vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test and the EpiDerm™ Skin Phototoxicity Assay. The negative results or the first non-phototoxic concentrations determined by the skin model were confirmed in vivo by means of human skin photopatch test. The phototoxicity of the essential oils was dependent on the content of photoactive substances and the solvent used. The human skin model test proved to be a useful tool for consideration of initial concentrations for confirmatory human photopatch tests, however, a safety factor of 10 has to be considered for extrapolation.

The in vitro tests for phototoxicity and skin irritation were also used during the development and synthesis of new UV filters, resulting in a novel broad-spectrum UV absorber with no adverse health effects.

Keywords: skin irritation, eye irritation, phototoxicity, cell culture Balb/c 3T3, reconstructed model EpiDerm™, EpiOcular™, 4h human patch test, human photopatch test, chemicals, essential oils, UV filters, cosmetics

Seznam použité literatury

- Adams, R.P. (1995) Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. Allured Publishing Corp., Carol Stream, USA.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Allen, R.G., Tresini, M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine* 28/3, 463-499.
- Anon. (1991) Collaborative Study on the Evaluation of Alternative Methods to the Eye Irritation Test, DOC. XI/632/91 - V/E/1/131/91, CEC, Brusel. Commission of the European Communities (CEC), 1991.
- Asthana, A., Larson, R.A., Marley, K.A., Tuveson, R.W. (1992) Mechanisms of citral phototoxicity. *Photochemistry and Photobiology* 56/2, 211-222.
- Averbeck, D., Averbeck, S., Dubertret, L., Young, A.R., Morlière, P. (1990) Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 7(2-4), 209-229.
- Babich, H., Borenfreund, E. (1990) Applications of the Neutral Red Cytotoxicity Assay to in vitro toxicology. *ATLA* 18, 129-144.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Balls, M., Blaauboer, B., Brusik, D., Frazier, J., Lamp, D., Pemberton, M., Reinhardt, C., Robertfroid, M., Rosenkranz, H., Schmid, B., Spielmann, H., Stamatii, A.L., Walum, E. (1990). Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA* 18, 313–337.
- Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H., Spielmann, H. (1995) The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in Vitro* 9, 871-929.
- Balls, M., Berg, N., Bruner, L.H., Curren, R.D., de Silva, O., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Fentem, J.H., Liebsch, M., Ohno, Y., Prinsen, M.K., Spielmann, H., Worth, A.P. (1999) Eye irritation testing: the way forward. The report and recommendations of ECVAM workshop 34. *ATLA* 27, 53-77.
- Barany, F., Wolff, S., Agosta, W.C. (1978) Novel temperature-dependent photochemical rearrangement of citral. *Journal of the American Chemical Society* 100, 1946–1948.
- Basketter, D.A., Griffiths, H.A. (1993) A study of the relationship between susceptibility to skin stinging and skin irritation. *Contact Dermatitis* 29/4, 185-188.
- Basketter, D.A., Griffiths, H.A., Wang, X.M., Wilhelm, K.-P., McFadden, J. (1996) Individual, ethnic and seasonal variability in irritant susceptibility of skin: the implications for a predictive human patch test. *Contact Dermatitis* 35, 208-213.
- Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997) The classification of irritants by human patch test. *Food and Chemical Toxicology* 35, 845-852.
- Basketter, D.A. (1999) Contact Irritation Models. In: *Toxicology of contact dermatitis: allergy, irriancy, and urticaria*. (Eds. Basketter, D.A., Gerberick, F., Kimber, I., Wills, C.). John Wiley and Sons, Chichester, UK. p.188.
- 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.
- Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris G.S., Ponc M. (2003) Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research* 42, 1–36.

Brown, J.E., Brown, S.B., Vernon, D.I. (1999) Photosensitising Drugs - Their Potential in Oncology. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 8/12, 1967-1979.

CIOMS. (2002) International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects. Prepared by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) in collaboration with the World Health Organization (WHO), Geneva. Online: http://www.cioms.ch/frame_guidelines_nov_2002.htm

Cotovio, J., Grandidier, M.H., Portes, P., Roguet, R., Rubinstenn, G. (2005) The in vitro acute skin irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. *ATLA* 33, 329-349.

Coverly, J., Peters, L., Whittle, E., Basketter, D.A. (1998) Susceptibility to skin stinging, non-immunologic contact urticaria and acute skin irritation: is there a relationship? *Contact Dermatitis* 38/2, 90-95.

Curren, R.D., Harbell, J.W. (1998) In vitro alternatives for ocular irritation. *Environmental Health Perspectives* 106, suppl. 2, 485-492.

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

DeBuys, H.V., Levy, S.B., Murray, J.C., Madey, D.L., Pinnell, S.R. (2000) Modern approaches to photoprotection. *Dermatologic Clinics* 18, 577-590.

Ditrichová, D. (2008) Fotosenzitivní potenciál léčiv pro zevní i celkové použití. *Medicina pro praxi* 5/10, 385-387. Online: www.medicinapropraxi.cz

Draelos, Z.K. (1995) Cosmetics in Dermatology. Churchill Livingstone Inc., New York, USA.

Draize, J.H., Woodward, G., Clavery, H.O. (1944) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 82, 377-390.

Dubakienė, R., Kuprienė, M. (2006) Scientific problems of photosensitivity. *Medicina* 42, 619-624.

Dubertret, L., Serraf-Tircazes, D., Jeanmougin, M., Morlière, P., Averbek, D., Young, A.R. (1990) Phototoxic properties of perfumes containing bergamot oil on human skin: Photoprotective effect of UVA and UVB sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 7(2-4), 251-259.

Earl, L.K., Dickens, A.D., Rowson, M.J. (1997) A critical analysis of the rabbit eye irritation test variability and its impact on the validation of alternative methods. *Toxicology in Vitro* 11, 295-304.

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.

ECETOC. (1995) Skin Irritation and Corrosion: Reference Chemicals Data Bank. ECETOC Technical Report No. 66, 1995. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, Belgium.

ECETOC. (1998) Technical Report no. 48 (2). Eye Irritation: Reference Chemicals Data Bank. Brussels, June 1998.

Eckert, R.L. (1992) The structure and function of skin. In: *Pharmacology of the skin*. (Ed. H. Mukhtar). CRC Press, Boca Raton, USA, 3-12.

ECVAM. (2004) EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200, 1-31. Online: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>

ECVAM. (2007) Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation. 27.4. 2007. Online: <http://ecvam.jrc.it>

ECVAM. (2007a) ESAC Statement on the conclusions of ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening test to identify potential ocular corrosives and severe irritants as determined by US EPA, EU (R41) and UN GHS classifications in a tiered testing strategy, as part of a weight of evidence approach. 27.4.2007. Online: <http://ecvam.jrc.it>

ECVAM. (2008) Statement on the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing. November 5, 2008. Online: <http://ecvam.jrc.it>

ECVAM. (2009) Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell function based in vitro assays for eye irritation testing. 10.7.2009. Online: <http://ecvam.jrc.it>

ECVAM. (2009a) ESAC statement on the performance under UN GHS of three in-vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the reference chemicals and defined accuracy values of the ECVAM skin irritation Performance Standards. July 8, 2009. Online: <http://ecvam.jrc.it>

EEC. (1976) Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976, on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Official Journal of the European Communities* 262, 27.9.1976, p.169.

EHS (1986) Směrnice rady ze dne 24. listopadu 1986 o sblížení právních a správních předpisů členských států týkajících se ochrany zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely (86/609/EHS). *Official Journal of the European Communities* L 358/1 18.12.1986, 292-320.

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.4 Akutní toxicita: dráždivé a leptavé účinky na kůži). *Úřední věstník Evropské unie* L 142, 31.5.2008, 182-191.

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.5. Akutní toxicita: dráždivé/leptavé účinky na oči). *Úřední věstník Evropské unie* L 142, 31.5.2008, 191-201.

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. (2008c) 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. (2009) Nařízení Komise (ES) č. 761/2009 ze dne 23. července 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 (Metoda B.46. Dráždění kůže in vitro: zkouška pomocí modelu rekonstruované lidské epidermis). *Úřední věstník Evropské unie* L 220, 24.8.2009, 24-35.

Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I., Zuang, V. (2007) ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. *ATLA* 35, 603–619.

Ettler, K. (2004) Ochrana lidské kůže před účinky ultrafialového záření. *Referátový výběr z dermatovenerologie* 46/4, 8-12.

- 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.
- Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliott, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., van de Sandt, J.J.M., Botham, P.A. (2001) A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 15, 57-93.
- Fulbright, R.M., Axelrod, D., Dunham, W.R., Marcelo, C.L. (1997) Fatty acid alteration and the lateral diffusion of lipids in the plasma membrane of keratinocytes. *Experimental Cell Research* 233/1, 128–134.
- Gettings, S.D., Dipasquale, L.C., Bagley, D.M., Casterton, P.L., Chudkowski, M., Curren, R.D., Demetrulias, J. L., Feder, P.I., Galli, C.L., Gay, R., Glaza, S.M., Hintze, K.L., Janus, J., Kurtz, P.J., Lordo, R.A., Marenus, K.D., Moral, J., Muscatiello, M., Pape, W.J.W., Renskers, K.J., Roddy, M.T., Rozen, G. (1994) The CTFA evaluation of alternatives program: An evaluation of in vitro alternatives to the Draize primary eye irritation test (Phase II) oil/water emulsions. *Food and Chemical Toxicology* 32/10, 943-976.
- Gettings, S.D., Lordo, R.A., Hintze, K.L., Bagley, D.M., Casterton, P.L., Chudkowski, M., Curren, R.D., Demetrulias, J.L., Dipasquale, I.C., Earl, L.K., Feder, P.I., Galli, C.L., Glaza, S.M., Gordon, V.C., Janus, J., Kurtz, P.J., Marenus, K.D., Moral, J., Pape, W.J.W., Renskers, K.J., Rheins, L.A., Roddy, M.T., Rozen, M.G., Tedeschi, J.P., Zyracki, J. (1996) The CTFA evaluation of alternatives program: An evaluation of in vitro alternatives to the Draize primary eye irritation test (Phase III) surfactant-based formulations. *Food and Chemical Toxicology* 34/1, 79-117.
- Green, E.S., Berenbaum, M.R. (1994) Research note: Phototoxicity of citral to *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) and its amelioration by Vitamin A. *Photochemistry and Photobiology* 60/5, 459-462.
- Griffiths, H.A., Wilhelm, K.-P., Robinson, M.K., Wang, X.M., McFadden, J., York, M., Basketter, D.A. (1997) Interlaboratory evaluation of a human patch test for the identification of skin irritation potential/hazard. *Food and Chemical Toxicology* 35/2, 255-260.
- Grindon, C., Combes, R., Cronin, M.T.D., Roberts, D.W., Garrod, J.F. (2008) An integrated decision-tree testing strategy for eye irritation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA* 36, 81-92.
- Gross, P.T., Ratner, L., De Rodriguez, O. (1987) An outbreak of phototoxic dermatitis due to limes. *American Journal of Epidemiology* 125/3, 509-514.
- Guarrera, M. (1988) Age and skin response to ultraviolet radiation. *J. Cutan. Ageing Cosmetic Dermatol.* 1, 135.
- Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1994) Mechanisms of ocular response to irritants. *Dermatotoxicology*. 5th Edition. (Eds. Marzulli, F.N., Maibach, H.I.) Taylor & Francis, Washington, USA, 299-306.
- Hamburger, V. (1997), "Wilhelm Roux: visionary with a blind spot." *Journal of the history of biology* 30/2, 229–238.
- Harrison, M.A., Rae, I.F. (1997) General techniques in cell culture. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1-4.
- Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Janusch Roi, A., Proeto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A., Zuang, V. (2004) A modular approach to the ECVAM principles on test validity. *ATLA* 32, 467-472.
- Harvell, J.D., Lammintausta, K., Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis. In: *Practical Contact Dermatitis* (Ed. Guin, J.D.). Mc Graw-Hill, New York, USA, 7–18.

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.

Hoffmann, S., Gallegos Saliner, A., Patlewicz, G., Eskes, C., Zuang, V., Worth, A.P. (2008) A feasibility study developing an integrated testing strategy assessing skin irritation potential of chemicals. *Toxicology Letters* 180, 9-20.

Holzhütter, H.G. (1997) A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. *ATLA* 25, 445–462.

Hrabálek, A., Vávrová, K. (2005) Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékárenství* 1, 8-11. Online: <http://www.linda-linie.cz/cps/rde/xbcr/zc/Prakticke-lekarenstvi-1-2005-SOLEN-0002.pdf>

ICCVAM. (2007) ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives. NIH Publication No: 07-4517. Online: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/ocutox_docs/OTeval/OTevalrpt.pdf

IFRA. (1992) Code of Practice. Latest amendments, June 1992. International Fragrance Association, Geneva. Online: <http://www.ifraorg.org>

IFRA. (2002) IFRA Standard, 36th Amendment, July 03, 2002. Online: <http://www.ifraorg.org>

IFRA. (2008) IFRA Code of Practice, 43rd Amendment (08-2008). Online: <http://www.ifraorg.org>

Jester, J.V. (2006) Extent of corneal injury as a biomarker for hazard assessment and the development of alternative models to the Draize rabbit eye test. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 25, 41-54.

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.

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.

Jones, P.A., Bracher, M., Marenus, K., Kojima, H. (1999) Performance of the Neutral Red Uptake Assay in the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Rabbit Eye Irritation Test. *Toxicology in Vitro* 13, 325-333.

Jones, P.A., Budynsky, E., Cooper, K.J., Decker, D., Griffiths, H.A., Fentem, J.H. (2001) Comparative evaluation of five in vitro tests for assessing the eye irritation potential of hair-care products. *ATLA* 29, 669-692.

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.

Kaddu, S., Kerl, H., Wolf, P. (2001) Accidental bullous phototoxic reactions to bergamot aromatherapy oil. *Journal of American Academy of Dermatology* 45, 458-461.

Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D., Spielmann, H. (2005) The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests – an assessment of the performance of the optimized test. *ATLA* 33, 351-367.

- 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>
- 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? *Toxicology Letters* 172, Suppl.1, 81-82.
- Kavli, G., Volden, G. (1984) Phytophotodermatitis. *Photodermatology* 1, 65-75.
- 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, 1298-1303.
- Kligman, AN, Breit, R. (1968) The identification of phototoxic drugs by human assay. *Journal of Investigative Dermatology* 51, 90-99.
- Klika, E. (1988) Histologie pro stomatology. Avicenum, zdravotnické nakladatelství Praha, 368-372, 417-426.
- Kolarova, H., Nevrelowa, P., Bajgar, R., Jirova, D., Kejlova, K., Strnad, M. (2007) In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicology in Vitro* 21, 249-253.
- Kubáč, L., Akrman, J., Horálek, J., Jírová, D., Bendová, H., Kejlová, K., Štěpánková, E., Horčíková, E. (2008) Polymerní UV filtr - účinné a zdravotně nezávadné aditivum pro fotoprotektivní emulze. In: *Proceedings, International Conference of Cosmetology*, October 1-3, Bratislava, Slovakia. (Ed. Hojerová, J.), 85-88.
- Kullavanijaya, P., Lim, H.W. (2005) Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 937-958.
- Kvapilíková, K. (2000) Anatomie a embryologie oka. 1.vydání. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.
- Leung, A.Y., Foster, S. (2003) Encyclopedia of Common Natural Ingredients. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 82-84, 342-343.
- Liebsch, M., Spielmann, H. (1998) INVITTOX Protocol no. 78: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. ECVAM, SIS Database, Last update October 2002. Online:<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>
- 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* (Eds. Clark, D.G. Lisansky, S.G., Macmillan, R.). 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.
- Ljunggren, B. (1990) Severe phototoxic burn following celery ingestion. *Archives of Dermatology* 126, 1334-1336.
- Loveday, K.S. (1996) Interrelationship of photocarcinogenicity, photomutagenicity and phototoxicity. *Photochemistry and Photobiology* 63, 369-372.
- Lovell, W.W., Sanders, D.J. (1992) Phototoxicity testing in guinea-pigs. *Food and Chemical Toxicology* 30/2, 155-160.

- Luepke, N.P. (1985) Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* 18, 442-449.
- Marzulli, F.N., Maibach, H.J. (1987) Phototoxicity (photoirritation) of topical and systemic agents. In: *Dermatotoxicology* (Eds. Marzulli, F.N., Maibach, H.I.). Hemisphere, Washington, DC., USA, 431- 440.
- Marzulli, F.N., Maibach, H.I. (2004) Photoirritation (Phototoxicity, Phototoxic Dermatitis). In: *Dermatotoxicology*, 6th Edition (Eds. Zhai, H., Maibach H.I.). CRC Press, Boca Raton, USA, 341-353.
- Masaki, H., Atsumi, T., Sakurai, H. (1995) Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 206/2, 474-479.
- MatTek Corporation. (2005) Ocular Irritation Protocol: Dilution Method for Use with EpiOcular™ Tissue Model (OCL-200). MK-24-007-0002. 09/06/05, 1-6.
- MatTek Corporation. (2007) Topical Application Ocular Irritation Assay for EU Labeling Using the EpiOcular™ Human Cell Construct. 11/12/07, 1-10.
- MatTek Corporation. (2009) In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), MK-24-007-0023, Rev.3/23/2009, 1-37.
- Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002) Extent of Initial Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36, 106–117.
- McNamee, P., Hibatallah, J., Costabel-Farkas, M., Goebel, C., Araki, D., Dufour, E., Hewitt, N.J., Jones, P., Kirst, A., Le Varlet, B., Macfarlane, M., Marrec-Fairley, M., Rowland, J., Schellau, F., Scheel, J. (2009) A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Eye irritation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54, 197-209.
- 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 7(2-4), 199-208.
- Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.
- Moysan, A., Morlière, P., Averbeck, D., Dubertret, L. (1993) Evaluation of phototoxic and photogenotoxic risk associated with the use of photosensitizers in suntan preparations: application to tanning preparations containing bergamot oil. *Skin Pharmacology* 6/4, 282-291.
- Müller, L., Kasper, P., Kersten, B., Zhang, J. (1998) Photochemical genotoxicity and photochemical carcinogenesis: Two sides of a Coin? *Toxicology Letters* 102/103, 383-387.
- Musajo, L., Rodighiero, M. (1972) Mode of photosensitizing action of furocoumarins. *Photophysiology* 7, 115-147.
- Naganuma, M., Hirose, S., Nakayama, Y., Nakajima, K., Someya, T. (1985) A study of the phototoxicity of lemon oil. *Archives of Dermatological Research* 278, 31-36.
- 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* 42/2, 183-192.
- Nilsson, R., Maurer, T., Redmond, N. (1993) A standard protocol for phototoxicity testing. Results from an interlaboratory study. *Contact Dermatitis* 28/5, 285 - 290.

- Nixon, G.A., Tyson, C.A., Wertz, W.C. (1975) Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicology and Applied Pharmacology* 31, 481-490.
- Noecker R. (2001) Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Advances in Therapy* 18, 205-215.
- Nohynek, G.J., Schaefer, H. (2001) Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33, 285-299.
- 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) 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. (2004a) 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. (2009) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. TG 437. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Adopted 7.9.2009. 1-18.
- OECD. (2009a) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. TG 438. Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Adopted 7.9.2009. 1-18.
- OECD. (2009b) Draft Proposal for a new Guideline in Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method. Online: http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
- OSN. (2007) Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (OSN) (GHS), OSN New York a Ženeva, druhé revidované vydání. http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html
- Partearroyo, M.A., Ostolaza, H., Goni, F.M., Barbera-Guillem, M. (1990) Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. *Biochemical Pharmacology* 40, 1323-1328.
- Pathak, M.A. (1986) Phytophotodermatitis. *Clinics in Dermatology* 4/2, 102-121.
- Patil, S., Patrick, E. (1998) Animal, human and in vitro test methods for predicting skin irritation. In: *Dermatotoxicology methods: the laboratory worker's vademecum* (Eds. Marzulli, F., Maibach, H.). Taylor and Francis, Washington, DC, USA, 89-104.
- Perkins, M.A., Osborne, R., Johnson, G.R. (1996) Development of an in vitro method for skin corrosion testing. *Fundamental and Applied Toxicology* 31, 9-18.
- Phillips, L., Steinberg, M., Maibach, H., Akers, W. (1972) A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 21/3, 369-382.
- Ponec, M., Gibbs, S., Pilgram, G., Boelsma, E., Koerten, H., Bouwstra, J., Mommaas, M. (2001) Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 14 (Suppl. 1), 63-71.
- Ponec, M., Boelsma, E., Gibbs, S., Mommaas, M. (2002) Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 15, Suppl. 1, 4-17.
- Prunieras, M., Regnier, M., Woodley D. (1983) Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* 81, 28-33.
- Rat, P. (1993) New microtitration fluorimetric technology - Applications to dermatotoxicity. *Nouv. Dermatol.* 12, 471-477.

Reader, S.J., Blackwell, V., O'Hara, R., Clothier, R.H., Griffin, G., Balls, M. (1990) Neutral Red release from pre-loaded cells as an in vitro approach to testing for eye irritancy potential. *Toxicology in Vitro* 4, 264-266.

Régnier, M., Caron, D., Reichert, U., Schaefer, H. (1993) Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82, 404-407.

Rienzi, G. (2006) How Cosmetics Led to the Creation of a New Field of Science. The Johns Hopkins University Gazette 36/9. Online: <http://www.jhu.edu/~gazette/2006/30oct06/30caat.html>

Robinson, M.K., Whittle, E., Basketter, D.A. (1999) A two center study of the development of acute irritation responses to fatty acids. *American Journal of Contact Dermatitis* 10, 136-145.

Robinson, M.K., McFadden, J.P., Basketter, D.A. (2001) Validity and ethics of the human 4-h patch test as an alternative method to assess acute skin irritation potential. *Contact Dermatitis* 45, 1-12.

Rogers, J.V., Gunasekar, P.G., Garrett, C.M., Kabbur, M.B., McDougal, J.N. (2001) Detection of oxidative species and lowmolecular-weight DNA in skin following dermal exposure with JP-8 jet fuel. *Journal of Applied Toxicology* 21/6, 521-525.

Roguet, R., Schaefer, H. (1997) Overview of in vitro cell culture technologies and pharmaco-toxicological applications. *Toxicology in Vitro* 11, 591-599.

Russell, W.M.S. (1995) The development of the Three Rs Concept. *ATLA* 23, 298-304.

Sayre, R.M., Dowdy, J.C. (2008) The increase in melanoma: Are dietary furocoumarins responsible? *Medical Hypotheses* 70/4, 855-859.

SCCNFP. (2003) The SCCNFP'S Notes of Guidance for Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation. SCCNFP/0690/03 Final. Online: http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/sccp/documents/out242_en.pdf

SCCP (Scientific Committee on Consumer Products EC). (2005) Opinion on furocoumarins in cosmetic products. SCCP/0942/05 Brussels, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General, 2005. Online: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_036.pdf

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

Siegel, S., Castellan, N.J. (1988) Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill, New York, USA.

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., Liebsch, M., Kalweit, S., Moldenhauer, S., Wirnsberger, T., Holzhütter, H.-G., Schneider, B., Glaser, S., Gerner, I., Pape, W.J.W., Kreiling, R., Krauser, K., Miltenburger, H.G., Steiling, W., Luepke, N.P., Muller, N., Kreuzer, H., Murmann, P., Spengler, J., Bertram-Neis, E., Siegemund, B., Wiebel, F.J. (1996) Results of a validation study in Germany on two in vitro alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3-NRU cytotoxicity test. *ATLA* 24, 741-858.

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., 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.

Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, 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 EPI SKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. *ATLA* 35, 559–601.

Stern, R.S., Nichols, K.T., Vakeva, L.H. (1997) Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA): the PUVA follow-up study. *New Engl. J. Med.* 336, 1041–1045.

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

Stern, M., Klausner, M., Alvarado, R., Renskers, K., Dickens, M. (1998) Evaluation of the EpiOcular™ tissue model as an alternative to the Draize eye irritation test. *Toxicology in Vitro* 12, 455-461.

Tisserand, R., Balacs, T. (1995) Essential Oil Safety. A Guide for Health Care Professionals. Churchill Livingstone, Elsevier Limited, Edinburgh, 83-89.

VÚOS. (2009) Závěrečná zpráva projektu "Fotoprotektivní pracovní prostředky" (FT- TA3/050), VÚ - 4693, 19.1.2009.

Wagner, H., Zghoul, N., Lehr, C.-M., Schäfer, U.F. (2002) Human skin and skin equivalents to study dermal penetration and permeation. In: *Cell culture models of biological barriers*, In vitro tests for drug absorption and delivery (Ed. Lehr, C.-M.). Taylor & Francis, 24-28.

Weil, C.S., Scala, R.A. (1971) Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicology and Applied Pharmacology* 19/2, 276-360.

Welss, T., Basketter, D.A., Schröder, K.R. (2004) In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicology in Vitro* 18, 231–243.

Worth, A.P., Balls, M. (2002) Alternative (non-animal) Methods for Chemicals Testing: Current Status and Future Prospects. *ATLA* 30, Suppl. 1, 35-45.

Young, A.R., Walker, S.L., Kinley, J.S., Plastow, S.R., Averbeck, 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 7(2-4), 231-50.

Zaynoun, S.T., Aftimos, B.A., Tenekjian, K.K., Kurban, A.K. (1981) Berloque dermatitis: a continuing cosmetic problem. *Contact Dermatitis* 7, 111-116.

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*. **IF 2,473**. V tisku.
2. Kolarova, H., Nevrelova, P., Bajgar, R., Jirova, D., **Kejlova, K.**, Strnad, M. (2007) In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicology in Vitro* 21/2, 249-253. **IF 2,473**
3. **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**
4. 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**
5. Tománková, K., Kolářová, H., Kolář, P., **Kejlová, K.**, Jírová, D. (2009) Study of cytotoxic effect of photodynamically and sonodynamically activated sensitizers in vitro. *Toxicology in Vitro* 23, 1465-1471. **IF 2,473**
6. Tomankova, K., Kolarova, H., Bajgar, R., Jirova, D., **Kejlova, K.**, Mosinger, J. (2009) Study of the Photodynamic Effect on the A549 Cell Line by Atomic Force Microscopy and the Influence of Green Tea Extract on the Production of Reactive Oxygen Species. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171, 549-558. **IF 2,303**
7. 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.

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., **Kejlova, 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.