

# Transdermální absorpce aktivních látek pro kosmetický průmysl

Alžběta Kastelíková

---

Bakalářská práce  
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Alžběta Kastelíková  
Osobní číslo: T17942  
Studijní program: B2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Transdermální absorpce aktivních látek pro kosmetický průmysl

### Zásady pro vypracování

Transdermální absorpce je jednou z klíčových biologických charakteristik látek používaných v kosmetice. V rámci teoretické části se student/ka seznámí s principy absorpce látek srkze kůže, metodami testování a klíčovými vlastnosti kůže vztáženými k transdermální absorpci. V praktické části se pak student/ka zaměří na zavedení nového postupu testování transdermální absorpce. Po zavedení metody pak provede sérii experimentů stanovení transdermální absorpce vybraných aktivních látek. *In vitro* studie bude prováděna v rámci Laboratoře buněčných kultur na Centru polymerních systémů UTB.

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.  
OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. doi.org/10.1787/20745788

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdenka Capáková, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2020

## PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Předložená bakalářská práce se zabývá testováním transdermální absorpce látek využívaných v kosmetickém průmyslu. Začátek teoretické části je věnován popisu kůže. Následně je popsána samostatná transdermální absorpce, její princip a různé metody jejího stanovení. V závěru teoretické části jsou popsány látky, které byly testovány v praktické části práce. Konkrétně se jedná o kofein, rutin a UV filtry avobenzon a oktinoxat. Pro testování transdermální absorpce *in vitro* byl použit přístroj PermeGear Fraction Collector FC33 a samotné testování bylo provedeno na kůži získané z ušního boltce prasete domácího. K určení množství látek, které byly schopny proniknout skrz kůži, byla využita UV-Vis spektroskopie.

Klíčová slova: transdermální absorpce, *stratum corneum*, penetrace, permeace, UV-Vis, kofein, rutin, UV filtry

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with testing of the transdermal absorption of substances used in the cosmetics. The first part of the theoretical section is devoted to the description of the skin. Subsequently, the principle and various methods for determination of the transdermal absorption are reported. The last section of the theoretical part describes the substances that were tested in the experimental part of the work, caffeine, rutin, and UV filters avobenzon and octinoxate. Transdermal absorption testing was performed *in vitro* using the skin obtained from the auricle of a domestic pig. The PermeGear Fraction Collector FC33 was used as experimental device. UV-Vis spectroscopy was used to determine the amount of substances which penetrated through the skin.

Keywords: transdermal absorption, *stratum corneum*, penetration, permeation, UV-Vis, caffeine, rutin, UV filters

Tímto bych chtěla velmi poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Zdence Capákové, Ph.D. za vedení, ochotu, trpělivost, vynaložený čas i lidský přístup při řešení bakalářské práce. Také děkuji Ing. Martině Kašparové, Ing. Simoně Káčerové a Ing. Monice Muchové za pomoc při zpracování výsledků. Mé srdečné poděkování patří také rodině, partnerovi a přátelům za podporu nejen při psaní této práce, ale během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
<b>1 KŮŽE</b> .....	<b>9</b>
1.1 STAVBA KŮŽE.....	9
1.2 BARIÉROVÁ FUNKCE KŮŽE .....	10
1.2.1 Tight junctions .....	11
1.3 KOŽNÍ DERIVÁTY .....	12
1.4 MIKROBIOM KŮŽE .....	12
1.5 ROZDÍLNOST KŮŽE MUŽŮ A ŽEN .....	13
<b>2 TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE</b> .....	<b>15</b>
2.1 TRANSPORT AKTIVNÍ LÁTKY V KŮŽI .....	16
2.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCI.....	17
2.2.1 Umístění a stav pokožky v místě aplikace .....	17
2.2.2 Teplota kůže .....	18
2.2.3 Enhancery.....	18
2.2.3.1 Fyzikální enhancery .....	18
2.2.3.2 Chemické ehancery.....	18
<b>3 METODY STANOVENÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE</b> .....	<b>20</b>
3.1 <i>IN VIVO</i> METODY .....	20
3.2 <i>IN VITRO</i> METODY .....	20
3.2.1 Difúzní cela .....	21
3.2.2 Metoda paralelního umělého membránového pronikání ( <i>PAMPA</i> ) .....	22
3.3 POSOUZENÍ INTEGRITY BARIÉRY VZORKŮ KŮŽE .....	22
<b>4 AKTIVNÍ LÁTKY PRO KOSMETICKÝ PRŮMYSL POUŽITÉ V PRAKTICKÉ ČÁSTI</b> .....	<b>24</b>
4.1 KOFEIN.....	24
4.2 RUTIN.....	24
4.3 UV FILTRY .....	25
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>26</b>
<b>5 TESTOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>27</b>
5.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ KŮŽE.....	27
5.2 EXPERIMENT .....	27
5.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ .....	29
<b>6 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>30</b>
6.1 KOFEIN.....	30
6.2 RUTIN.....	31
6.3 UV FILTRY .....	31
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>34</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>35</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>41</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>42</b>

## ÚVOD

Největším orgánem lidského těla je kůže. Je to zároveň i místo, které umožňuje mnoha látkám penetrovat do vnitřního prostředí našeho organismu. Tento přestup látek skrz kůži se nazývá transdermální absorpce. Jelikož většina kosmetických přípravků se běžně aplikuje na pokožku, je sledování průniku látek skrz vrstvy kůže v kosmetickém průmyslu velmi důležité.

Transdermální absorpci je možné stanovit různými metodami. Lze například využít *in vivo* stanovení, které se provádí na dobrovolnících. Tady ovšem narážíme hlavně na etické problémy. Proto se v dnešní době využívá více *in vitro* metod. U tohoto typu testování je možno využít kůži lidskou, jenž je často obtížně k sehnání, proto bývá nejčastěji nahrazována kůží vepřovou. Pro tyto účely se využívá konkrétně kůže získaná z ucha prasete domácího, a to z toho důvodu, že má velmi podobné vlastnosti jako kůže lidská.

Transdermální absorpce může být ovlivněna mnoha faktory, nejen charakterem dané látky, ale také stavem samotné kůže. Ovlivňují ji faktory jako jsou např. věk či teplota kůže, ale také struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti látek aplikovaných na kůži.

Předložená bakalářská práce se zabývá právě problematikou transdermální absorpce. Zejména je práce zaměřena na stanovení průniku látek využívaných v kosmetickém průmyslu skrz kůži získanou z ucha prasete domácího. Testované byly kofein, rutin a UV filtry avobenzon a oktinoxat. Množství látek, které penetrovalo skrz prasečí kůži bylo detekované pomocí metody UV-Vis.



## I. TEORETICKÁ ČÁST

# 1 KŮŽE

Dle Kittnara „*tkáň povrchu těla (tj. kůže a sliznice zažívacího, dýchacího, vylučovacího a rozmnožovacího ústrojí) představují první linii obrany organismu před škodlivými vlivy prostředí a jsou významným prvkem stálosti vnitřního prostředí.*“ (1) Kůže je nejrozsáhlejší orgán lidského těla, pokrývá plochu přibližně 2 m<sup>2</sup> a to v závislosti na individuální hmotnosti a výšce jedince. (2) Primární funkcí pokožky je ochrana těla před ztrátou vody a vniknutím potencionálních toxických či dráždivých látek, alergenů a mikrobů. (3) Kůže minimalizuje účinky UV a IR záření tím, že je absorbuje a rozptyluje teplo pomocí regulace toku krve a pocení. (4) Dále kůže zaručuje výměnu plynů a toxinů s vnějším prostředím prostřednictvím transpirace tekutin – pocení, které je důležité také pro termoregulaci. (2)

## 1.1 Stavba kůže

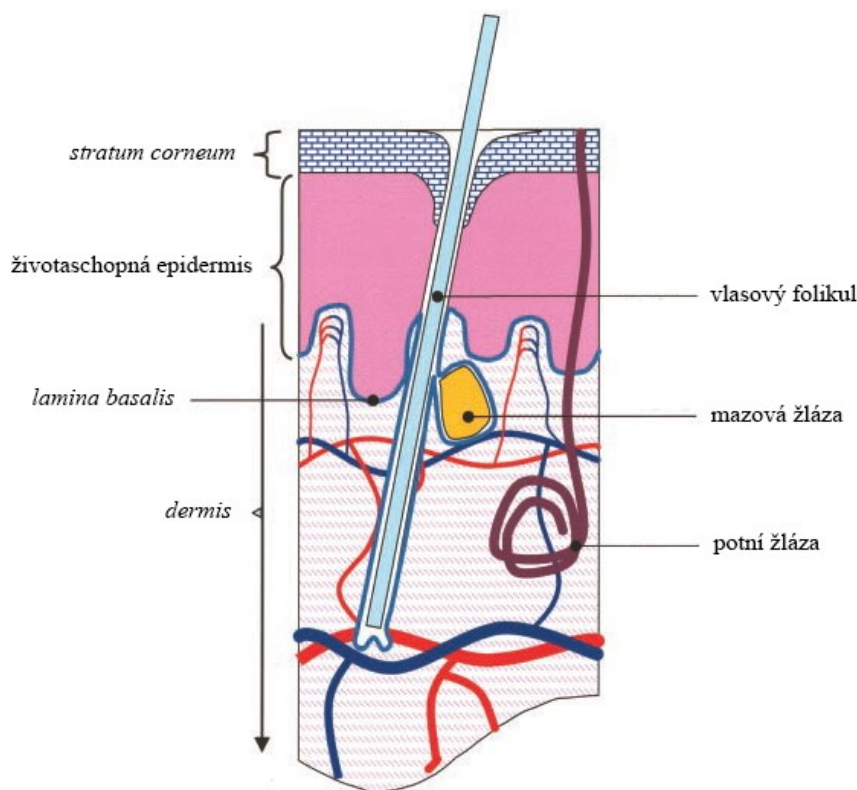
Kůže je tvořena směrem od povrchu třemi vrstvami:

- *epidermis* – nevaskularizovaná vrstva, tloušťka asi 100 μm;
- *dermis* – vaskularizovaná vrstva, tloušťka 500 až 3 000 μm; (3)
- *subcutis* – vrstva vazivové a tukové tkáně, umožňuje spojení kůže s hlouběji uloženými strukturami a slouží jako pohyblivá vrstva a podložka odolná tlaku. (5)

**Epidermis:** Histologicky je *epidermis* klasifikována jako stratifikovaná skvamózní epitelální vrstva, ve které jsou keratinocyty uspořádány do pěti různých vrstev, konkrétně *stratum basale* (ve styku s *dermis*), *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (SC). Keratinocyty různých vrstev se liší tvarem a obsahem cytoplazmy v důsledku progresivní modifikace, která probíhá od *stratum basale* ke *stratum corneum*. Tento proces udržuje *epidermis* zdravou a defenzivně kompetentní díky kontinuální regeneraci a obnově jejích složek. Nepřímo také stanoví rozlišení *epidermis* na životaschopnou *epidermis* (VE – viable *epidermis*) a *stratum corneum*, kde jsou keratinocyty zcela diferencovány na bezjaderné buňky zvané korneocyty. (4) Ztráta buněk z povrchu *stratum corneum* procesem deskvamace je vyvážena tvorbou buněk v dolních vrstvách *epidermis*. (3) Ve VE jsou kromě keratinocytů lokalizovány také melanocyty produkující melanin a Langerhansovy buňky odpovědné za imunitní odpověď kůže. (6)

**Dermis:** je místem syntézy kolagenu a elastinu. Obsahuje krevní cévy, nervy, potní žlázy, vlasové folikuly a mazové žlázy. (7) Kolagen typu I a II představuje přibližně 75 % suché hmotnosti dermis. (8) Její význam spočívá v kapilárních anastomózách, které přivádějí

živiny a kyslík na *epidermis* a odstraňují z *dermis* produkty buněčného metabolismu a pronikající cizorodé látky. (4)



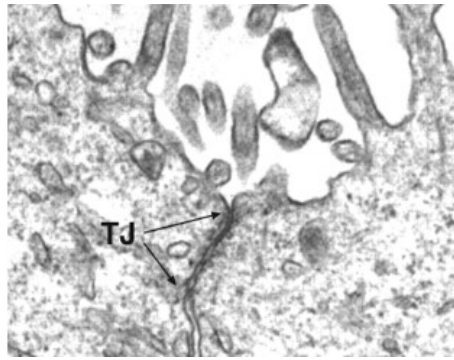
Obrázek 1 Schématické znázornění průřezu kůže, upraveno podle (4)

## 1.2 Bariérová funkce kůže

Většina obranných funkcí *epidermis* spočívá ve vrstvě *stratum corneum*, která je proto označována jako kožní bariéra. Toto tvrzení je však příliš zjednodušené, neboť bariérová funkce je ve skutečnosti výsledkem spolupráce a interakce mezi makrostrukturou a mikrostrukturou *stratum corneum*, dvojrozměrnou a trojrozměrnou supramolekulární organizací lipidové matrix SC a celého složení *stratum corneum*. (4) V suchém stavu má SC tloušťku 10 až 15  $\mu\text{m}$ , při hydrataci značně bobtná a může dosáhnout tloušťky až 40  $\mu\text{m}$ , což způsobuje zvýšenou propustnost této vrstvy při nabobtnání. (8)

Strukturu samotného SC lze vysvětlit pomocí tzv. modelu „cihel a malty“, ve kterém korneocyty představují cihly, zatímco jako malta působí mezibuněčné lipidy a přirozené hydratační faktory (NMF, Natural Moisturizing Factor). (3) Je však důležité nahlížet na tento model v kontextu, že korneocyty jsou polygonální, protáhlé a ploché. Mezibuněčná lipidová matrix je vytvářena keratinocyty ve střední až horní části vrstvy *stratum granulosum*,





Obrázek 3 Tight junctions zobrazený elektronovou mikroskopií (11)

### 1.3 Kožní deriváty

Kožní deriváty lze rozlišit na vlasové folikuly s přidruženými mazovými žlázami, ekrinní a apokrinální potní žlázy a nehty. Vlasové folikuly jsou přítomny po celém povrchu kůže s výjimkou rtů, dlaní a chodidel. Zasahují do podkoží a nabízejí permeační cesty hluboko do kůže. Hustota vlasových folikulů se liší podle druhu a místa těla. (12)

Produktem mazových žláz je kožní maz – *sebum*, který kůži zjemňuje a chrání ji proti smáčení. Čihák uvádí, že „hlavní hmota mazu je složena z různých triacylglycerolů, které jsou v průběhu sekrece mazu štěpeny esterasami korynebakterií (jež jsou konstantně ve folikulech chlupů a na povrchu kůže). Štěpením vznikají volné mastné kyseliny, jež způsobují fyziologické kyselé prostředí povrchu kůže, které je ochranou proti řadě mikrobiálních agens.“ (13) Kožní maz se podílí na regulaci pH povrchu pokožky. (12)

### 1.4 Mikrobiom kůže

Každý člověk má svůj jedinečný mikrobiom, jehož podoba se odvíjí od zděděných genů, míst pobytu, přijímané potravy, užívaných léků i odžitých let. Pod pojmem mikrobiom se zpravidla myslí především mikrobiom trávicího traktu. Ve skutečnosti však existuje také specifické osídlení kůže, kožní mikrobiom. Mikrobiom kůže má různou podobu v čase i prostoru. (14) Povrch kůže novorozence je kolonizován mikroorganismy bezprostředně po narození. (15) Kožní mikrobiom dítěte dospívá během jednoho až tří let, a poté dosáhne stabilního stavu. (14)

Mikroprostředí na kůži se značně liší mezi jednotlivci i v rámci různých částí kůže jednotlivce, neboť strukturální základy se mění na základě různých podmínek. Za prvé, genetická diverzita vede k individuálním rozdílům ve struktuře kůže. Za druhé, různá místa kůže jednotlivce vykazují ve svých strukturách odlišné charakteristiky. Například tloušťka kůže

se může pohybovat od 0,5 mm na očních víčkách až po 4 mm na chodidlech, což je způsobeno tvorbou více vrstev korneocytů. Za třetí, struktura kůže se mění během vývoje i stárnutí, třeba doba epidermálního průchodu látek je u 50letých jedinců dvojnásobná oproti novorozencům. Bylo zjištěno, že léky, zejména steroidy, snižují tloušťku kůže a zvyšují tak citlivost na její poškození způsobenou oslabenými kolagenovými vlákny. (15)

Mikrobiom lidské kůže se skládá z bakterií, eukaryot a virů. Většina těchto mikroorganismů je lokalizována v povrchových vrstvách epidermis, žlázových traktech a vlasových folikulech. Vztah mezi mikroorganismy a hostitelem lze definovat jako vzájemnou symbiózu, avšak u imunokompromitovaných jedinců mohou některé mikroorganismy porušit strukturu kůže a kolonizovat nezvyklou oblast, například dermis či podkoží. (15) Bylo zjištěno, že rody *Propionibacterium* a *Staphylococcus* se vyskytují především na mazových místech kůže, jako je obličej a trup, zatímco na vlhkých místech, jako jsou podpaží, paže a kolena, se vyskytují *Corynebacterium*, *Staphylococcus* a různé  $\beta$ -*Proteobacteria*. Suché oblasti kůže mají často nejbohatší mikrobiální společenství, dominují zde  $\beta$ -*Proteobacteria*, *Corynebacterium* a *Flavobacterium*. (16)

## 1.5 Rozdílnost kůže mužů a žen

Pochopení pohlavně podmíněných rozdílů ve fyziologii pokožky může pomoci zlepšit kosmetické ošetření a celkové zdraví kůže. Některé z fyziologických rozdílů mezi mužskou a ženskou kůží lze připsat různým úrovním pohlavních a stresových hormonů. Kůže mužů je silnější než kůže žen, snížení tloušťky začíná u žen i mužů ve věku 45 let. (17) U žen je silnější tloušťka podkožního tuku a liší se také distribuce tuku v těle. Zatímco u mužů se tuk hromadí v oblasti břicha a v horních částech těla, u žen ve spodních částech těla, zejména v oblasti hýždí a stehen. (18)

Muži mají také vyšší produkci mazu a větší velikost pórů. Pot, produkováný potními žlázami roztroušenými po celém těle, jejichž počet se s věkem nezvyšuje, je vylučován na povrch kůže. Je to bezbarvý hypotonický roztok bez zápachu s pH mezi 4,5 a 5,5. Kožní maz a pot ovlivňují kyselost kůže, u žen byla na předloktí zjištěna hodnota pH  $5,6 \pm 0,4$ , zatímco u mužů  $4,6 \pm 0,4$ . (17) Mužská kůže je citlivější na UV záření, a to jak z akutní expozice, tak i z delšího časového rámce spojeného s chronickou expozicí. Muži by tedy měli být více chráněni před sluncem. (19)

Sluneční ultrafialové paprsky, které dopadají na zemský povrch jsou rozděleny do dvou kategorií: UVB záření (280-315 nm) a UVA záření (320-400 nm). UVB je považováno za hlavní příčinu poškození DNA a bílkovin v kožní tkáni. UVA způsobuje také poškození DNA, ale navíc způsobuje produkci singletového kyslíku v buňkách lidské kůže. Studie na myším modelu SKH-1 ukázaly, že akutní UVB expozice indikuje vyšší hladiny zápalových reakcí, ale nižší hladiny poškození DNA u samic ve srovnání se samci. Samci myši SKH-1 mají sníženou schopnost eliminovat reaktivní druhy kyslíku produkované po vystavení UVB záření, a také sníženou imunoprotektivní odpověď po expozici UVA záření ve srovnání se samicemi. Přírozené či umělé snížení exprese estrogenového receptoru u samic tedy vede ke snížené imunoprotektivní odpovědi po expozici UVA. (20)

Určitá onemocnění kůže vykazují výrazné rozdíly mezi pohlavími. Například ženy mají vyšší výskyt onemocnění pojivové tkáně, například sklerodermie<sup>1</sup>, zatímco muži jsou častěji postiženi nemelanomovou rakovinou kůže. Důvody, které jsou základem rozdílů mezi pohlavími ve vývoji kožních onemocnění, zůstávají do značné míry neznámé, pravděpodobně jsou však způsobeny mnoha faktory, mezi které patří rozdíly ve fyziologii kůže, pohlavní hormony, genetika, věk, životní styl i povolání. (21)

---

<sup>1</sup> sklerodermie – chronické fibrotizující onemocnění, charakterizované ukládáním nadměrného množství kolagenu do extracelulární matrix různých orgánů

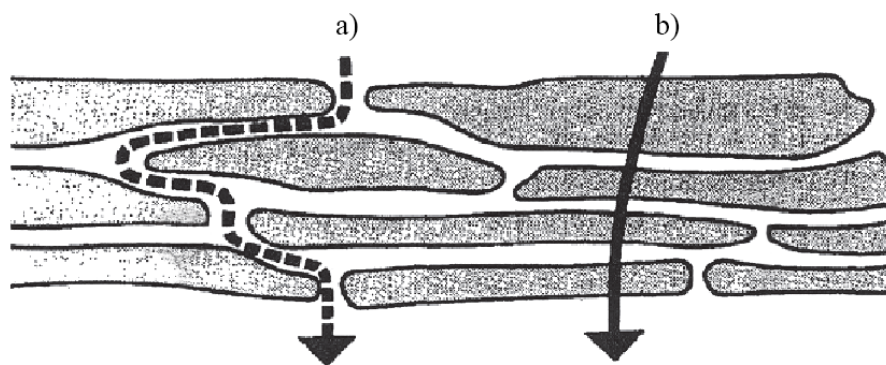
## 2 TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE

Dle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development) i Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organization) je dermální absorpce termínem, který popisuje „celou cestu přenosu látky z vnějšího povrchu kůže do krevních nebo lymfatických cév organismu“. (22) Transdermální absorpci lze rozdělit do tří kroků:

- penetrace – vstup látky do konkrétní vrstvy či struktury kůže, například vstup sloučeniny do *stratum corneum*, (23)
- permeace – prostup látky z jedné vrstvy do druhé, která je strukturně odlišná,
- resorpce – příjem látek přes cévní či lymfatický systém do organismu. (3)

Existují tři hlavní mechanismy, kterými může dojít k absorpci kůže (Obrázek 4):

- transcelulární absorpce – látka je přenášena přes korneocyty do a z buněčné membrány,
- intercelulární (mezibuněčná) absorpce – látka je přenášena kolem korneocytů v extracelulárním prostoru,
- transfolikulární absorpce (kožními deriváty) – látka obchází korneocyty a vstupuje do kůže přes vlasové folikuly, mazové a potní žlázy. (24)



Obrázek 4 Schématické zobrazení a) intercelulární a b) transcelulární absorpce, upraveno podle (10)

Kožní deriváty představují pouze 0,1 % celkového povrchu lidské kůže a příspěvek prostupu skrze kožní deriváty je malý, přestože tato cesta umožňuje pronikání nabitých molekul a velkých polárních sloučenin, např. léků na bázi peptidů. (8)



Porozumění procesům absorpce pokožky je nutné z několika důvodů, jako je posouzení bezpečnostních aspektů chemických látek, xenobiotik i kosmetických přípravků a využití k dodávání léčivých látek na kůži a potencionálně i do systémového oběhu. (12)

Léčivým přípravkem se podle Zákonu č. 378/2007 Sb. o léčivech rozumí „*látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat, nebo látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy*“. (25) V Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ve článku 2 se kosmetickým přípravkem rozumí „*jakákoliv látka nebo směs určená pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem jejich čištění, parfemace, změny jejich vzhledu, jejich ochrany, jejich udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů*“.

Příkladem léčivých přípravků aplikovaných na povrch pokožky jsou topické přípravky pro léčbu kožních poruch, jako je akné a kožní zánětlivá onemocnění, zahrnující dermatitidu, lupenku či *lupus erythematoses*. Transdermální terapie musí zajistit absorpci významného množství léčiva k dosažení účinných koncentrací v cévním systému – v některých případech je pronikání léčiv zaměřeno na oblasti těla v blízkosti místa působení, kde se očekává regionální efekt, např. ve svalech a kloubech. (8)

## 2.1 Transport aktivní látky v kůži

Transport aktivní látky či léčiva v kůži je proces zahrnující několik kroků:

- i. rozpuštění a uvolnění látky z formulace,
- ii. přechod látky do *stratum corneum*,
- iii. difúze látky přes *stratum corneum*, hlavně mezibuněčnými lipidy,
- iv. přechod látky ze *stratum corneum* do životaschopných vrstev *epidermis*,
- v. difúze látky životaschopnými vrstvami *epidermis* do *dermis*,
- vi. absorpce látky kapilárními cévami.

Výběr látek vhodných pro průnik kůží je založen na mnoha faktorech, včetně fyzikálně chemických a farmakokinetických vlastnostech látky. Ideální vlastnosti látky vybrané pro kožní podání jsou:

- nízká molekulová hmotnost ( $< 500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),
- rozpustnost ve vodě a olejích pro dosažení vysokého koncentračního gradientu a zvýšení difúzní síly na kůži,
- nízká teplota tání ( $< 200 \text{ }^\circ\text{C}$ ), jež souvisí s vhodnou rozpustností,
- zvýšený, ale vyvážený rozdělovací koeficient. (8)

Nejpoužívanějšími parametry pro predikci penetrace kůží jsou molekulová hmotnost a logaritmičticky transformovaný rozdělovací koeficient oktanol-voda ( $\log K_{\text{oct}}$ ). (26) Hodnota  $\log K_{\text{oct}}$  by měla být mezi 1 a 3. (7) Obecně platí, že látky s molekulovou hmotností větší než  $500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  nepronikají kůží. Tato horní mez molekulové hmotnosti je dána především uspořádáním lipidů mezi korneocyty. (3) Látka by také měla mít dostatečnou lipofilitu pro přechod do SC, ale také dostatečnou hydrofilitu pro přechod do VE a případně do systémového oběhu. (27)

## 2.2 Faktory ovlivňující transdermální absorpci

Absorpční chování kůže je citlivé na parametry, které způsobují změnu uspořádání lipidů ve SC. Patří zde parametry fyzikální, jako například teplota, UV záření, koncentrace vody uvnitř SC, i chemické, kterými rozumíme sloučeniny, jež se mísí s lipidy SC a mění jejich fázové chování. (28) Vliv má také umístění a stav pokožky, který je ovlivňován pohlavím, věkem i typem pleti. Pohlavní hormony ovlivňují propustnost kůže kvůli mírně odlišnému chemickému složení a struktuře SC. Je také známo, že permeabilita kůže klesá s věkem. (4) Záměrně mohou být použity také látky zvyšující penetraci zvané enhancery, tedy zesilovače. (28)

### 2.2.1 Umístění a stav pokožky v místě aplikace

U zdravých jedinců je v různých oblastech těla rozdílná tloušťka SC, rozmístění i hustota potních a mazových žláz i objem vlasového folikulárního infundibula (tj. vyústění na povrch kůže). Dle těchto faktorů dochází k upřednostňování průchodu látky transcelulární či transfolikulární cestou. Při srovnání experimentálních údajů by proto mělo být zvaženo umístění na těle (*in vivo*) či zdroj biopsie (*ex vivo*).

Například při sledování penetrace nanočástic přes vlasové folikuly by měla být upřednostňována oblast čela (4), neboť oblast pokrytá vlasovými folikuly zde dosahuje 13 % povrchu kůže a folikulární infundibula představují 20 % objemu SC. Infundibulum je klíčo-

vou součástí v penetračních procesech, protože působí jako dlouhodobý rezervoár, který zpomaluje penetraci nanočástic. (28)

Onemocnění a jiné patologické stavy (např. popálení či infekce), nadměrné užívání detergentů a/nebo dlouhodobé vystavení klimatizovaným, nezvlhčeným prostředím mohou být zodpovědné za různé změny kůže, jako například změna tloušťky *epidermis*, narušení integrity *stratum corneum*, a tedy i bariérové funkce kůže, dehydratace SC či změna mikrostruktury SC v důsledku extrakce nebo modifikace lipidů SC. (4)

### 2.2.2 Teplota kůže

Jelikož vnitřní teplota těla je 37 °C a na povrchu kůže je teplota 32 °C, je v pokožce mírný teplotní gradient. Zvýšení teploty kůže infračerveným ozářením, horečkou nebo zvýšenou vaskularizací zvyšuje propustnost kůže i TEWL. (28)

### 2.2.3 Enhancery

Narušení strukturální organizace intercelulární lipidové domény *stratum corneum* může zvýšit permeaci kůže. Toho lze dosáhnout použitím chemických zesilovačů nebo fyzikálních technik. (7)

#### 2.2.3.1 Fyzikální enhancery

Fyzikální techniky používané pro zvýšení permeace kůže zahrnují iontoforézu, elektroporaci, sonoforézu a microneedling. (7) Iontoforéza využívá malé množství fyziologicky přijatelného elektrického proudu k pohonu nabitých a neutrálních látek do těla. Použitím elektrody se stejnou polaritou, jakou má látka, je látka vháněna do kůže elektrostatickým odpuzováním. (29) Elektroporace využívá aplikaci napět'ového pulsu, sonoforéza ultrazvukové vlny a při microneedling dochází k propichování *epidermis* pomocí speciálních mikrojehel. (7)

#### 2.2.3.2 Chemické enhancery

Mezi běžné chemické enhancery patří dimethylsulfoxid (DMSO), alkoholy, mastné kyseliny, jako je kyselina olejová, povrchově aktivní látky (PAL), terpeny a většina organických rozpouštědel. Tyto látky zvyšují permeabilitu kůže narušením nebo fluidizací struktury SC či interakcí s keratinem. Interakce těchto látek s lipidy SC je dvojitá, 1) mohou se smíchat s lipidy SC a změnit tak jejich organizaci, nebo 2) mohou část těchto lipidů extrahovat z kůže, čímž se modifikuje jejich celkový obsah i složení v kůži. (28)

Do kategorie látek zvyšující chemickou permeaci patří také biologicky rozložitelné polymery. Biologicky rozložitelné polymery se využívají jako enkapsulační materiály aktivních složek. Protože mnoho biologicky aktivních látek není stabilních a jsou citlivé na teplotu, pH, světlo i oxidaci, vyžadují zapouzdření k ochraně před nežádoucí degradací a také za účelem specifického a řízeného uvolňování. Výhody použití biologicky rozložitelných polymerů v kosmetických aplikacích spočívají v tom, že jsou obecně nereaktivní při kontaktu s lidským tělem a mohou být rozloženy nebo metabolizovány a odstraněny z těla běžnými metabolickými cestami. (7)

Často používanými polymery jsou polysacharidy chitosan a cyklodextriny. Bylo popsáno, že chitosan má schopnost zlepšit pronikání kůží změnou struktury keratinu a také zvyšuje obsah vody ve SC. Dále může díky svému kladnému náboji za mírně kyselých podmínek depolarizovat záporně nabitou buněčnou membránu a snížit tak membránový potenciál a pohánět aktivní látku či léčivo kůží. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, mající hydrofobní vnitřní dutiny a hydrofilní vnější povrch. Jejich důležitou charakteristikou je schopnost tvořit inkluzní komplexy s hydrofobními molekulami vázanými uvnitř dutiny, což z nich tvoří ideální sloučeniny pro systém dodávání kosmetických látek. (7)

### 3 METODY STANOVENÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE

Posouzení dermálního absorpčního potenciálu účinných látek v kosmetických, agrochemických a průmyslových chemických výrobcích, které přicházejí do styku s kůží, je klíčovou součástí hodnocení rizik pro člověka. Je tím zajištěno, že za normálních nebo očekávaných podmínek, na základě potencionálního nebezpečí určité chemické látky, existuje dostatečná rezerva bezpečnosti pro výrobce, zpracovatele i konečné uživatele, kteří mohou být těmito látkám vystaveni. Posouzení dermální absorpce se řídí směrnicemi OECD Test Guideline 428: Skin absorption: *in vitro* method a OECD Test Guideline 427: Skin absorption: *in vivo* method. Přístup OECD 428 je nyní široce využíván, zejména v oblasti kosmetického a agrochemického průmyslu a tvoří klíčovou součást procesu posuzování a registrace rizik pro nové a stávající chemické látky, které přicházejí do styku s pokožkou buď záměrně, nebo během jejich pracovního využití. (30) Nejužitečnější údaje jsou získány ze studií *in vivo* na lidech, která jsou však nákladná a náročná na práci i čas. (31)

#### 3.1 *In vivo* metody

Jednou z metod *in vivo* je studium dobrovolníků, kdy po perkutánní absorpci aktivních látek může následovat měření sekrece sloučenin v moči a potu. V praxi je však tento přístup významně omezen citlivostí detekce, etickými problémy, omezením regulátorů pro použití radioaktivních materiálů u lidí a účinností vylučování sloučenin a jejich metabolických produktů.

Nejvhodnější *in vivo* metoda pro predikci transdermální absorpce zahrnuje měření hladiny sloučeniny, která pronikla do *stratum corneum* fyzickým stripováním jednotlivých vrstev *stratum corneum*. Místo aplikace musí být čisté, bez kosmetických přípravků nebo jiných cizích látek a suché. Odstranění zbytkové formulace před samotným stripováním, na konci periody pronikání, je velmi důležité a je třeba dbát na vhodný výběr média (detergent nebo rozpouštědlo), které nezpůsobí následnou redistribuci ve vrstvách pod povrchem. Odstraňování kůže se provádí pevným přitlačením lepící pásky na povrch kůže a jejím odtržením, první nebo i druhý pásek by neměly být použity, protože obsahují povrchové zbytky formulace. Získaný materiál se kvantifikuje vhodnými analytickými postupy. (23)

#### 3.2 *In vitro* metody

Nejrelevantnějším modelem pro hodnocení absorpce aktivních látek či léčiv *in vitro* je lidská kůže získaná z plastických operací či kadáverů. Dostupnost lidské kůže je však omeze-

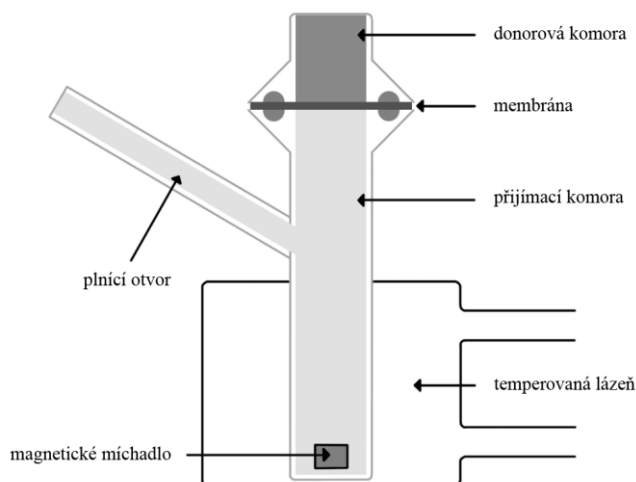
ná a často se používají zvířecí modely, jako jsou domácí prasata, krysy, myši či morčata, přičemž kůže prasečího ucha vykazuje výsledky srovnatelné s výsledky normální lidské kůže. (8) Vepřová kůže je také využívána pro vývoj formulací a výběr produktů farmaceutickým průmyslem před nákladnějšími studiemi na kůži lidské. (30)

### 3.2.1 Difúzní cela

Nejpoužívanějším experimentálním zařízením pro hodnocení uvolňování a pronikání látek obsažených v topických a transdermálních aplikačních systémech do kůže je difúzní cela (komůrka). První práce v této oblasti byla vyvinuta Thomasem J. Franzem v roce 1970. (8) Základní konfigurace experimentálního aparátu je složena z:

- donorové komory – formulace je aplikována na semipermeabilní membránu, kterou uvolňovaná látka proniká,
- přijímací komory – vzorky se zde odebírají pro analýzu.

Modifikací původní Franzovy difúzní cely je vertikální difúzní cela. Tento přístroj byl použit k vyhodnocení různých formulací, jako jsou krémy, gely, masti a náplasti. Jsou dostupné různé konfigurace o různých objemových kapacitách v přijímací komoře a účinné difúzní oblasti. Difúzní celu je také možné modifikovat iontoforézou. Iontoforéza je fyzikální proces, kterým se zvyšuje pronikání léčiva kůží pomocí elektrického pole. Difúzní komůrky jsou upraveny elektrodami stříbra a chloridu stříbrného v donorové komoře pro aplikaci proudu na povrch kůže. Formulace jsou připraveny ve vodném vehikulu (hydrogely) a léčivo je ionizováno. (8)



Obrázek 5 Francova difúzní cela, upraveno podle (3)

Experimentální podmínky pro hodnocení prostupnosti kůží zahrnují receptorové médium udržované za stálého magnetického míchání a teploty. Složení média musí zajistit podmínky klesání, protože koncentrace léčiva nesmí dosáhnout hodnot  $> 10 \%$  jeho nasycení. Z tohoto důvodu musí být léčivo volně rozpustné v receptorovém médiu. Doporučená receptorová média jsou vodné pufrы související s fyziologickým prostředím. V některých případech je nezbytné použití přísad ke zvýšení rozpustnosti léčiva, avšak tyto přísady nesmí narušovat integritu membrány nebo měnit propustnost léčiva. Využívány jsou například neionogenní PAL (např. Tween 80), hovězí sérový albumin, polyethylenglykol či ethanol. Pro zabránění mikrobiologického růstu v médiu mohou být přidány také konzervační látky, jako je gentamicin, formaldehyd (0,1%) nebo azid sodný (0,02 - 0,05%). Pro kvantifikaci léčiva se doporučuje vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). (8)

### 3.2.2 Metoda paralelního umělého membránového pronikání (PAMPA)

Metoda paralelního umělého membránového pronikání (PAMPA – The Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) je rychlý a ekonomicky efektivní model propustnosti pro predikci transdermální penetrace sloučenin. PAMPA modely byly publikovány pro predikci gastrointestinální absorpce a pro modelování hematoencefalické bariéry. Pro přizpůsobení propustnosti bariéry omezující rychlost v lidské kůži byly pro model kůže-PAMPA vybrány syntetické centramidy, což jsou analogy ceramidů přítomných ve *stratum corneum*. Konečná lipidová směs kůže a PAMPA (centramid, FFA a cholesterol) byla optimalizována na základě údajů ze tří různých databází lidské kůže. Tato nová PAMPA membrána prokázala vysokou schopnost predikce. Vzhledem k nákladové efektivitě a snadné standardizovatelnosti napříč laboratořemi může být kůže-PAMPA dobrou alternativou k aktuálně používaným měřením penetrace kůže a v některých případech může být schopna nahradit modely, které používají skutečnou lidskou kůži. (31)

### 3.3 Posouzení integrity bariéry vzorků kůže

Před aplikací zkoušené sloučeniny musí být každý vzorek kůže zkontrolován z hlediska integrity, použitá zkouška však nesmí změnit parametry určené k měření. Integrita kůže může být hodnocena měřením propustnosti pro tritiovanou vodu nebo referenční sloučeniny. Tyto metody však trvají několik hodin a v závislosti na sloučenině mohou modifikovat samotnou vrstvu *stratum corneum*. Jelikož je z *in vivo* experimentů znám lineární vztah

mezi transepidermální ztrátou vody a penetrací, je měření TEWL vhodnou alternativní metodou pro použití *in vitro*. (23)

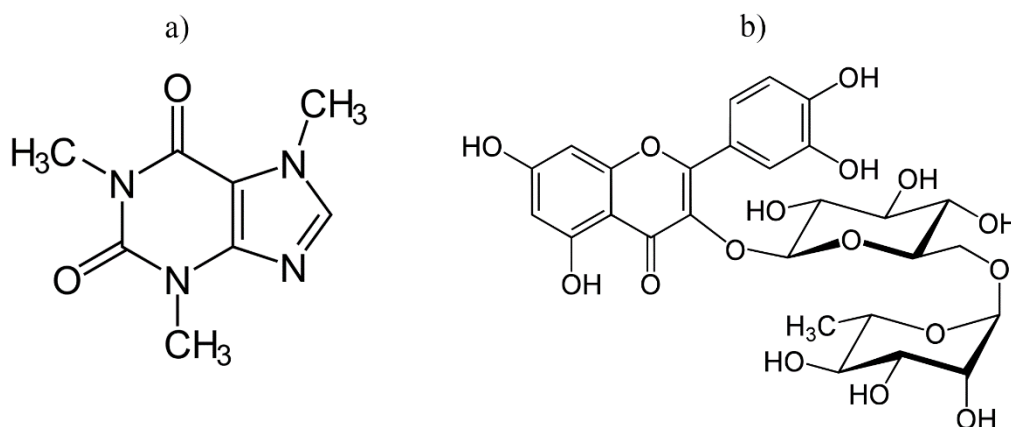


## 4 AKTIVNÍ LÁTKY PRO KOSMETICKÝ PRŮMYSL POUŽITÉ V PRAKTICKÉ ČÁSTI

### 4.1 Kofein

Kofein (1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion) je alkaloid rostlinného původu. Podává se lokálně i transdermálně pro různé farmaceutické i kosmetické aplikace a OECD je doporučován jako modelová hydrofilní sloučenina v toxikologii kůže.

Kofein inhibuje enzym fosfodiesterázu a má antagonistický účinek na centrální adenosinové receptory. Je stimulatorem centrální nervové soustavy, může vyvolat bdělost a zvýšenou duševní aktivitu, také zvyšuje rychlost a hloubku dýchání. Hlavní výhody nárokové pro použití kofeinu v topických kosmetických přípravcích spočívají v tom, že zabraňuje nadměrnému hromadění tuku v kůži, podporuje lymfatickou drenáž a chrání pokožku před fotodamováním. (32)



Obrázek 6 a) kofein (32), b) rutin (33)

### 4.2 Rutin

Rutin, známý také jako rutosid, je flavonoid přítomný v mnoha rostlinách (např. pohanka). (33) Má mnohočetné terapeutické účinky, avšak jeho biologická dostupnost je při orálním použití velmi nízká.

Ze všech prospěšných účinků je nejvýznamnější protizánětlivá aktivita. Rutin se uplatňuje při léčbě zánětlivých stavů spojených s nadměrnou tvorbou leukotrienu, jako je například revmatoidní artritida. Dále snižuje hladinu cholesterolu v krvi, používá se při léčbě kapi-

lární křehkosti a hypertenze. Inhibuje kožní oxidační stres, a má také chemoprotektivní, antimikrobiální i antifugální vlastnosti. (34)

### 4.3 UV filtry

Filtrem ultrafialového záření (UV filtr) je dle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích (35) „*látko, která je výhradně nebo převážně určena k ochraně kůže před určitým ultrafialovým zářením prostřednictvím absorpce, odrazu nebo rozptýlení tohoto záření*“. Toto nařízení také obsahuje Přílohu VI – Seznam filtrů ultrafialového záření povolených v kosmetických přípravcích.

Ochrany kůže před ultrafialovým zářením může být dosaženo lokální aplikací fyzikálních filtrů, které záření vychylují či rozptylují nebo chemických filtrů, jež UV záření absorbují. (36) Požadované místo působení UV filtrů je omezeno na povrch kůže či na *stratum corneum*. Bylo však prokázáno, že penetrace do kůže, permeace kůže a retence UV filtrů v kůži se může mezi použitými formulacemi významně lišit. (37)

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 TESTOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE *IN VITRO*

Cílem práce bylo stanovení transdermální absorpce *in vitro* vybraných kosmeticky aktivních látek kofeinu (Sigma Aldrich, USA) a rutinu (Sigma Aldrich, USA), UV filtrů avobenzonu (Butyl Methoxydibenzoylmethane) (Sigma Aldrich, USA) a oktinoxatu (Ethylhexyl Methoxycinnamate) (Sigma Aldrich, USA). Měření transdermální absorpce bylo provedeno na přístroji Permeagear Fraction Collector FC33 (Německo) a získané frakce byly analyzovány spektrofotometricky na přístroji UV-Vis-NIR-Spectrometer Lambda 1050 (Perkin Elmer, USA).

### 5.1 Příprava vzorků kůže

Testování bylo provedeno na kůži z ušního boltce prasete domácího. Uši nesmějí být poškozené ani tepelně upravené, z důvodu porušené kožní bariéry, což by mohlo zkreslit výsledky testování. Boltce byly do doby jejich použití skladovány v plastových sáčcích při teplotě - 20 °C, před testováním byly volně rozmrazeny v lednici při teplotě 4 °C.

Nejprve byly z ušních boltců odstraněny štětiny pomocí žiletky. Poté byla kůže o plné tloušťce opatrně oddělena od podkladové chrupavky pomocí skalpelu. Z oddělené kůže bylo vystříženo několik vzorků čtvercového tvaru o velikosti 2,5×2,5 cm. U všech vzorků byla změřena tloušťka pomocí mikrometru a pro testování byly vybrány vzorky s podobnou tloušťkou.



Obrázek 7 Kůže (vpravo) oddělená od ušního boltce

### 5.2 Experiment

Permeagear Fraction Collector FC33 obsahuje recirkulační vodní lázeň, permeační cely, do kterých se umísťují vzorky kůže, peristaltické čerpadlo s hadičkovými kazetami, zásobní

láhev pro receptorovou kapalinu a polici se zásobníky na lahvičky, do kterých jsou sbírány jednotlivé frakce měření.



Obrázek 8 Přístroj PermeGear Fraction Collector FC33 (vlevo), detail na permeační cely (vpravo)

Na vodní lázni byla nastavena teplota 32 °C, která byla konstantní po celou dobu experimentu. Do zásobní láhve byl připraven 1 litr receptorové kapaliny tvořené z fosfátového pufru (PBS – Phosphate Buffered Saline) (Biosera, Francie) s 0,05% přídavkem gentamicinu (Biosera, Francie). Na peristaltickém čerpadle byl nastaven konstantní průtok receptorové kapaliny 33,3  $\mu\text{l}/\text{min}$ , do lahviček jsou tedy jímány 2 mililitry za hodinu. Po úplném naplnění všech hadiček i permeačních cel receptorovou kapalinou byly do cel vloženy vzorky prasečí kůže vrstvou *stratum corneum* směrem vzhůru. Před nanesením testovaných látek byla kůže 30 minut ponechána ve styku s receptorovou kapalinou.

Poté byly na střed vzorků kůže mikropipetou nanесeny konečné dávky, tedy 10  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , roztoků jednotlivých testovaných látek. Koncentrace roztoku kofeinu byla 10 mg/ml, roztoku rutinu 0,1 mg/ml. Roztok kofeinu i rutinu byl připraven rozpuštěním v destilované vodě. Pro UV filtry byla zvolena nejvyšší koncentrace, která může být v přípravku připraveném k použití podle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) 1223/2009. Pro avobenzon 5 % (w/w) a pro oktinoxat 10 % (V/V). Roztok avobenzonu byl připraven rozpuštěním v neutrálním oleji Caprylis (Nature-Store, Česká republika) a roztok oktinoxatu v destilované vodě.

Celková doba expozice byla 20 h, přičemž bylo získáno 6 frakcí z expozičních časů 1 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h a 20 h. Frakce byly až do doby analýzy uchovávány při - 20 °C.

### **5.3 Spektrofotometrické stanovení**

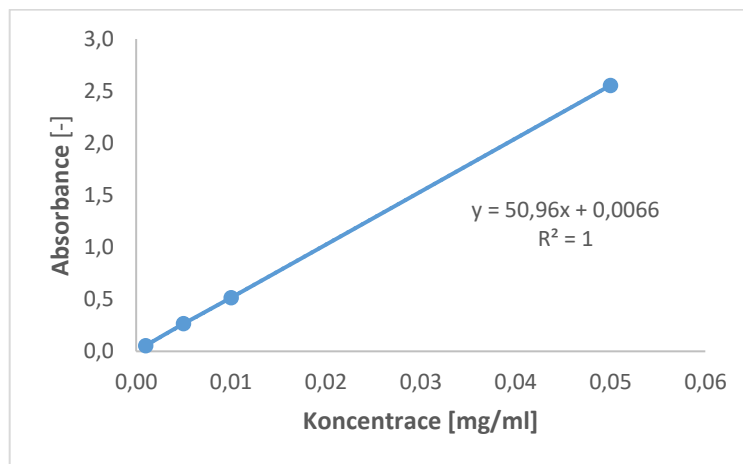
Získané frakce všech testovaných látek byly analyzovány spektrofotometricky na UV-Vis-NIR-Spectrometer Lambda 1050. Pro zjištění absorbovaného množství testovaných látek byly pro všechny tyto látky vytvořeny kalibrační křivky.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

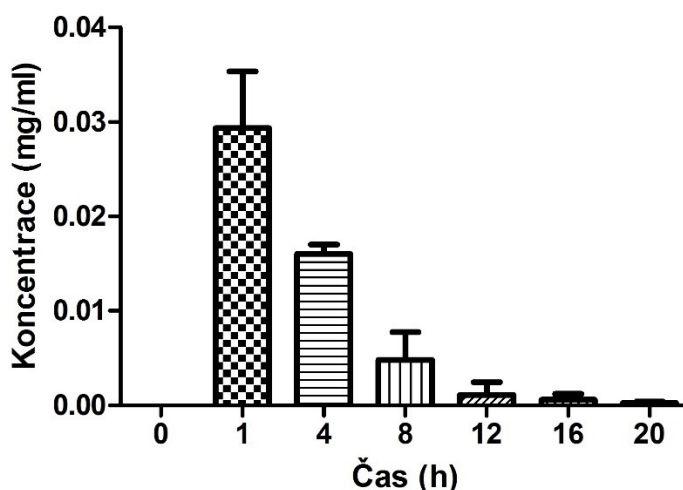
### 6.1 Kofein

Kofein byl jako jediná testovaná látka detekovaný v receptorové kapalině všech frakcí získaných po transdermální absorpci na PermeGear Fraction Collector FC33. Celkově bylo ve všech frakcích detekováno 0,52 % aplikovaného kofeinu, přičemž nejvyšší množství kofeinu permeovalo již během první hodiny, konkrétně 0,29 %, s rostoucím časem toto množství klesalo. (Obrázek 10).

Nízké procento permeovaného kofeinu v tomto měření může být zdůvodněno jednak tím, že dominantní absorpční cestou kofeinu je folikulární absorpce, (38) a také zjištěním uvedeným v práci Mujica (39), že *stratum corneum* zadržuje 70-80 % aplikovaného kofeinu. Skutečné množství kofeinu zadržovaného v kůži by bylo možné zjistit stripováním. Stripování bylo plánováno jako součást experimentů, nicméně s ohledem na situaci kolem pandemie COVID-19 je nebylo možné realizovat.



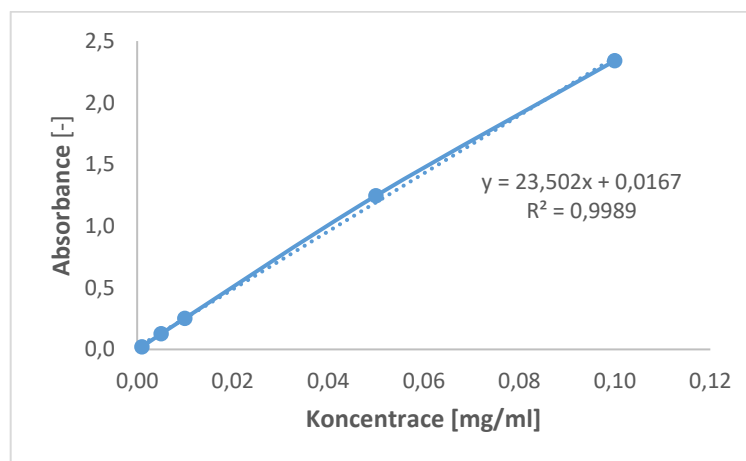
Obrázek 9 Kalibrační křivka kofeinu při vlnové délce 273 nm



Obrázek 10 Množství permeovaného kofeinu v jednotlivých frakcích

## 6.2 Rutin

Rutin nebyl spektrofotometricky detekován v žádné frakci, byla stanovena pouze jeho kalibrační křivka (obrázek 11). Použití rutinu je omezeno jeho nízkou rozpustností ve vodě. Permeace rutinu však může být zvýšena použitím chemických enhnacerů, například dle Dhiman a Singh (40) je *in vitro* permeace kůže získané z prasečího ucha vyšší u ethosomových formulací rutinu ve srovnání s čistým rutinem.



Obrázek 11 Kalibrační křivka rutinu při vlnové délce 353 nm

## 6.3 UV filtry

Analýza frakcí získaných transdermální absorpcí avobenzonu i oktinoxatu neprokázala permeaci těchto látek, v žádné frakci nebyly UV filtry detekovány. Z tohoto důvodu byly všechny frakce jednotlivého filtru slity dohromady a odpařeny na rotační vakuové odparce

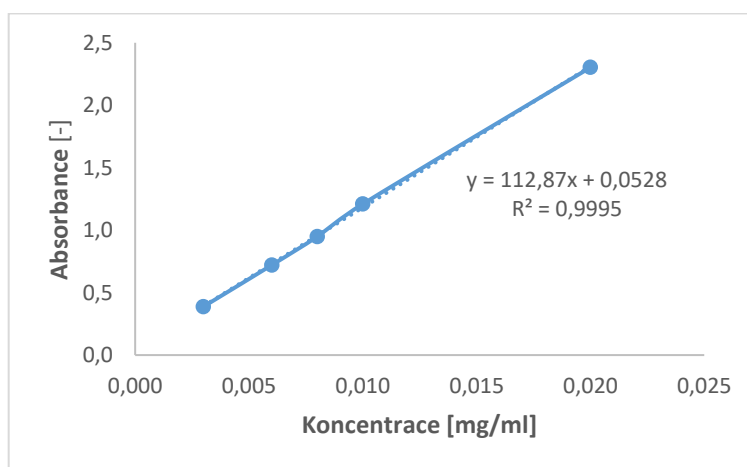


Heidolph Hei-Vap při 45,5 °C. Z důvodu vzniku sraženiny byly roztoky následně filtrovány přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 µm. Ani u těchto zahuštěných roztoků však nebylo spektrofotometricky detekováno žádné množství avobenzonu či oktinoxatu. Pro obě látky byly stanoveny kalibrační křivky (Obrázek 13, 14).

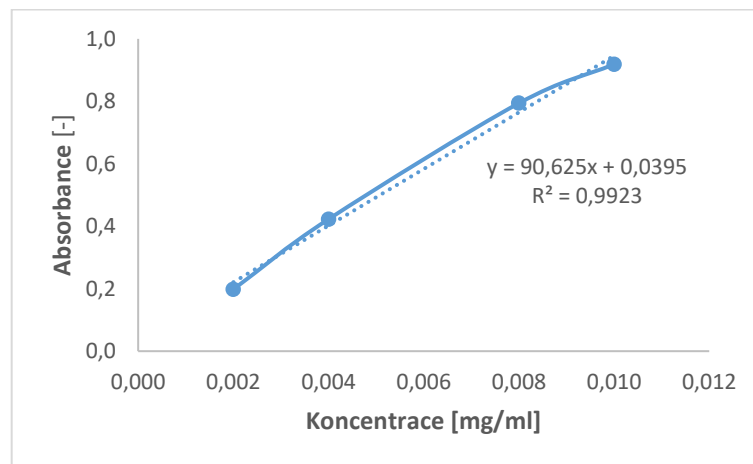
Chatelain et al. (37) testovali penetraci avobenzonu i oktinoxatu *in vitro* na lidské kůži. Dle jejich výsledků nepenetroval po 6 h kůži ani jeden z uvedených UV filtrů, avobenzon byl detekován pouze v *epidermis*, oktinoxat byl detekován i v *dermis*, ale pouze 0,1 % z aplikované dávky. Freitas et al. (41) zjistili, že 90 % testovaných UV filtrů bylo při transdermální absorpci zadrženo již ve *stratum corneum* a žádné množství kůži neprostoupilo. Testování bylo stanoveno *in vitro* na kůži z prasečích ušních boltců po dobu 12 h. Pro detekci oktinoxatu i avobenzonu v různých vrstvách kůže by bylo nutné použít stripování.



Obrázek 12 Rotační vakuová odparka Heidolph Hei-Vap



Obrázek 13 Kalibrační křivka avobenzonu při vlnové délce 358 nm



Obrázek 14 Kalibrační křivka oktinoxatu při vlnové délce 308 nm

## ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce se věnuje problematice transdermální absorpce. První část popisuje orgán, na kterém probíhá transdermální absorpce, v tomto úseku je probána stavba a vlastnosti kůže. Dále je práce zaměřena na popis samostatné transdermální absorpce. Rozebraný je i její mechanismus, způsob průniku látky do/skrz kůži a taktéž faktory ovlivňující přestup látek do kůže. Další kapitola je věnována různým metodám stanovení dermálního absorpčního potenciálu látek. V závěru práce jsou popsány látky, které se využívají v kosmetickém průmyslu a byly vybrány pro testování transdermální absorpce.

Cílem praktické části bylo experimentální stanovení transdermální absorpce. Vybrány byly látky, které se běžně využívají v kosmetických prostředcích, jako jsou např. pleťové krémy, a to konkrétně kofein a rutin. Dále byly testovány UV filtry, které se běžně používají v prostředcích na opalování, avobenzon a oktinovat. Jelikož se jedná o kosmetické prostředky, které se aplikují přímo na kůži, je jejich transdermální potenciál velmi důležitý. Pro testování byla využita kůže z ušních boltců prasete domácího. Samostatné měření probíhalo pomocí přístroje PermeGear Fraction Collector FC33. Sledované látky byly aplikované na kůži a postupně byly odebírány jednotlivé frakce pronikající skrz kůži až po dobu 20 hodin. Celkem bylo odebráno šest frakcí, a to po expozici 1 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h a 20 h. Množství látek, které byly schopné projít do receptorové kapaliny, bylo detekováno pomocí spektroskopické metody UV-Vis.

Ze zkoumaných látek bylo možno detekovat v jednotlivých frakcích po transdermální absorpci pouze kofein. Z toho důvodu byly jednotlivé frakce pro UV filtry sesbírány dohromady a následně byly zahuštěny na vakuové odparce. Avšak ani po tomto kroku nebylo možné detekovat jakékoliv množství UV filtru v receptorové kapalině. Z těchto výsledků lze usoudit, že jedině kofein byl schopný resorpce skrz kůži. Ostatní látky byly pravděpodobně postupně zadržovány v jednotlivých vrstvách. Podle dostupné literatury byly testované látky nejpravděpodobněji zadrženy již vrstvou *stratum corneum*. Toto by se dalo potvrdit stripováním, díky kterému by bylo možné určit množství zachycené látky v jednotlivých vrstvách. Avšak kvůli výskytu pandemie Covid-19 nebylo možné v rámci bakalářské práce stripování dokončit.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN isbn978-80-247-3068-4.
- (2) LIUZZI, Roberta, Antonio CARCIATI, Stefano GUIDO a Sergio CASERTA. Transport efficiency in transdermal drug delivery: What is the role of fluid microstructure?. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. vol. 139. 2016, **139**, 294-305 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.064. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777651530326X>
- (3) BARTOSOVA, L. a J. BAJGAR. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Current Medicinal Chemistry* [online]. vol. 19. 2012, **19**(27), 4671-4677 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.2174/092986712803306358. ISSN 09298673. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/230767581\\_Transdermal\\_Drug\\_Delivery\\_In\\_Vitro\\_Using\\_Diffusion\\_Cells](https://www.researchgate.net/publication/230767581_Transdermal_Drug_Delivery_In_Vitro_Using_Diffusion_Cells)
- (4) BAROLI, Biancamaria. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality?. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. vol. 99. 2010, **99**(1), 21-50 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1002/jps.21817. ISSN 00223549. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916303434>
- (5) LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN isbn978-80-247-3729-4.
- (6) EHRHARDT, Carsten a Kim KWANG-JIN. *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects Volume VII: Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models*. 1. vyd. New York: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-74900-6.
- (7) AMMALA, Anne. Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. vol. 35. 2013, **35**(2), 113-124 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1111/ics.12017. ISSN 01425463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12017>
- (8) RUELA, André Luís Morais, Aline Gravinez PERISSINATO, Mônica Esselin de

- Sousa LINO, Paula Silva MUDRIK a Gislaine Ribeiro PEREIRA. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. vol. 52. 2016, **52**(3), 527-544 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1590/s1984-82502016000300018. ISSN 1984-8250.
- (9) MATHUR, Vineet, Yamini SATRAWALA a MithunSingh RAJPUT. Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics* [online]. vol. 4. 2010, **4**(3) [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.4103/0973-8398.72115. ISSN 0973-8398. Dostupné z: <http://www.asiapharmaceutics.info/text.asp?2010/4/3/173/72115>
- (10) MADISON, Kathi C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. vol. 121. 2003, **121**(2), 231-241 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15303560>
- (11) MATTER, K. a M. S. BALDA. Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *Journal of Cell Science* [online]. vol. 120. 2007, **120**(9), 1505-1511 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1242/jcs.005975. ISSN 0021-9533. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.005975>
- (12) EHRHARDT, Carsten a Kim KWANG-JIN. *Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models: Biotechnology: Pharmaceutical Aspects (VII)* [online]. New York, 2008 [cit. 2020-05-19]. ISBN 978-0-387-74901-3.
- (13) ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2011-2016. ISBN isbn978-80-247-5636-3.
- (14) YONG, Ed. *Obsahují davy: o mikrobech v nás, kolem nás a o jejich fascinujícím vlivu na náš život*. Vydání první. Přeložil Filip DRLÍK. V Brně: Jan Melvil Publishing, 2017. Pod povrchem. ISBN 978-80-7555-027-9.
- (15) MARCHESI, Julian. *The human microbiota and microbiome*. Boston, MA, USA: CABI, 2014. Advances in molecular and cellular microbiology, 25. ISBN 9781780640495.

- (16) MOISSEL-EICHINGER, Christine, Alexander J. PROBST, Giovanni BIRARDA, Anna AUERBACH, Kaisa KOSKINEN, Peter WOLF a Hoi-Ying N. HOLMAN. Human age and skin physiology shape diversity and abundance of Archaea on skin. *Scientific Reports* [online]. vol. 7. 2017, 7(1) [cit. 2019-12-15]. DOI: 10.1038/s41598-017-04197-4. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-04197-4>
- (17) GIACOMONI, Paolo U., Thomas MAMONNE a Matthew TERI. Gender-linked differences in human skin. *Journal of Dermatological Science* [online]. 3. 2009, 3(55), 144-149 [cit. 2019-05-23]. Dostupné z: [https://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811\(09\)00164-9/fulltext](https://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811(09)00164-9/fulltext)
- (18) TUR, Ethel. Physiology of the skin—Differences between women and men. *Clinics in Dermatology* [online]. vol. 15. 1997, 15(1), 5-16 [cit. 2019-12-26]. DOI: 10.1016/S0738-081X(96)00105-8. ISSN 0738081X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X96001058>
- (19) BAKI, Gabriella a Kenneth S. ALEXANDER. *Introduction to cosmetic formulation and technology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. ISBN 9781118763780.
- (20) KOPEC, Rachel E., Jonathan SCHICK, Kathleen L. TOBER, Ken M. RIEDL, David M. FRANCIS, Gregory S. YOUNG, Steven J. SCHWARTZ a Tatiana M. OBERYSZYN. Sex differences in skin carotenoid deposition and acute UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice after consumption of tangerine tomatoes [online]. vol. 59. 2015, 59(12), 2491-2501 [cit. 2019-06-19]. DOI: 10.1002/mnfr.201500317. ISSN 16134125. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201500317>
- (21) ANDERSEN, Louise K. a Mark D. P. DAVIS. Sex differences in the incidence of skin and skin-related diseases in Olmsted County, Minnesota, United States, and a comparison with other rates published worldwide. *International Journal of Dermatology* [online]. vol. 55. 2016, 55(9), 939-955 [cit. 2019-06-19]. DOI: 10.1111/ijd.13285. ISSN 00119059. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijd.13285>

- (22) *Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro* [online]. 103. 2009, **103**(7) [cit. 2020-05-19]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_07\\_533-539.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf)
- (23) MAGDASSI, Shlomo a Elka TOUITOU. *Novel Cosmetic Delivery System*. 10. New York: Marcel Dekker, 1999. ISBN 0-8247-1703-1.
- (24) *Dermal Absorption: Environmental Health Criteria No. 235* [online]. 3. Geneva: World Health Organization, 2006 [cit. 2020-05-20]. ISBN 9241572353.
- (25) ČESKÁ REPUBLIKA. Zákon o léčivech a i změnách některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů*. 2007. Praha: Tiskárna Ministerstva vnitra, 2007, ročník 2007, částka 115, číslo 378.
- (26) FARAHMAND, Sara a Howard I. MAIBACH. Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. vol. 367. 2009, **367**(1-2), 1-15 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.11.020. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517308007783>
- (27) KALIA, Y. Modeling transdermal drug release. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. vol. 48. 2001, **48**(2-3), 159-172 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00113-2. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X01001132>
- (28) BOLZINGER, Marie-Alexandrine, Stéphanie BRIANÇON, Jocelyne PELLETIER a Yves CHEVALIER. *Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane* [online]. vol. 17. 2012, **17**(3), 156-165 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.02.001. ISSN 13590294. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029412000234>
- (29) BANGA, Ajay K. *Transdermal and Intradermal Delivery of Therapeutic Agents : Application of Physical Technologies*. 1. vyd. Boca Raton: Taylor Francis, 2011. ISBN 9781439805091.
- (30) HEYLINGS, Jon R., Diane J. DAVIES a Rebecca BURTON. Dermal absorption of testosterone in human and pig skin in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. vol. 48.

- 2018, **48**, 71-77 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.12.014. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233317303806>
- (31) SINKÓ, Bálint, Teresa M. GARRIGUES, György T. BALOGH, Zsombor K. NAGY, Oksana TSINMAN, Alex AVDEEF a Krisztina TAKÁCS-NOVÁK. Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. vol. 45. 2012, **45**(5), 698-707 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.01.011. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098712000541>
- (32) LUO, Lin a Majella E. LANE. Topical and transdermal delivery of caffeine. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. vol. 490. 2015, **490**(1-2), 155-164 [cit. 2020-05-21]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.050. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731500469X>
- (33) YINGYUEN, Panida, Suchada SUKRONG a Muenduen PHISALAPHONG. Isolation, separation and purification of rutin from Banana leaves (*Musa balbisiana*). *Industrial Crops and Products* [online]. vol. 149. 2020, **149** [cit. 2020-05-21]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112307. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669020302235>
- (34) DAS, Malay K. Design and Evaluation of Phyto-Phospholipid Complexes (Phytosomes) of Rutin for Transdermal Application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [online]. 2014 [cit. 2019-10-31]. DOI: 10.7324/JAPS.2014.40110. ISSN 22313354. Dostupné z: <http://japsonline.com/counter.php?aid=1349>
- (35) *Nářízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích*. In: . b.r.
- (36) HAQUE, T., J.M. CROWTHER, M.E. LANE a D.J. MOORE. Chemical ultraviolet absorbers topically applied in a skin barrier mimetic formulation remain in the outer stratum corneum of porcine skin. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. vol. 510. 2016, **510**(1), 250-254 [cit. 2020-05-22]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.041. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316305178>



- (37) CHATELAIN, E., B. GABARD a C. SURBER. Skin Penetration and Sun Protection Factor of Five UV Filters: Effect of the Vehicle. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. vol. 16. 2003, **16**(1), 28-35 [cit. 2020-05-22]. DOI: 10.1159/000068291. ISSN 1660-5527. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/68291>
- (38) TRAUER, Sindy, Alexa PATZELT, Nina OTBERG et al. Permeation of topically applied caffeine through human skin - a comparison of in vivo and in vitro data. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. vol. 68. 2009, **68**(2), 181-186 [cit. 2020-05-21]. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x. ISSN 03065251. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x>
- (39) MUJICA ASCENCIO, Saul, ChunSik CHOE, Martina C. MEINKE, Rainer H. MÜLLER, George V. MAKSIMOV, Walter WIGGER-ALBERTI, Juergen LADEMANN a Maxim E. DARVIN. Confocal Raman microscopy and multivariate statistical analysis for determination of different penetration abilities of caffeine and propylene glycol applied simultaneously in a mixture on porcine skin ex vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. vol. 104. 2016, **104**, 51-58 [cit. 2020-05-22]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.04.018. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641116301424>
- (40) DHIMAN, Anju a Deepika SINGH. Development, characterization & in vitro skin permeation of rutin ethosomes as a novel vesicular carrier. *International Journal of Biomedical Research* [online]. vol. 4. 2013, **4**(10), 559-566 [cit. 2020-05-22]. DOI: 10.7439/ijbr.v4i10.398. ISSN 0976-9633. Dostupné z: <http://ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/887>
- (41) FREITAS, J.V., F.S.G. PRAÇA, M.V.L.B. BENTLEY a L.R. GASPAR. Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. vol. 484. 2015, **484**(1-2), 131-137 [cit. 2020-05-22]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.062. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315001805>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DMSO	Dimethylsulfoxid
FFA	Volné mastné kyseliny
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	Infračervený
NMF	Přirozený hydratační faktor
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PAL	Povrchově aktivní látky
PAMPA	Metoda paralelního umělého membránového pronikání
SC	<i>Stratum corneum</i>
TEWL	Transepidermální ztráta vody
UV	Ultrafialový
VE	Životaschopná <i>epidermis</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obrázek 1 Schématické znázornění průřezu kůže, upraveno podle (4)</i> .....	10
<i>Obrázek 2 Ceramid 6 (10)</i> .....	11
<i>Obrázek 3 Tight junctions zobrazený elektronovou mikroskopií (11)</i> .....	12
<i>Obrázek 4 Schématické zobrazení a) intercelulární a b) transcelulární absorpce, upraveno podle (10)</i> .....	15
<i>Obrázek 5 Francova difúzní cela, upraveno podle (3)</i> .....	21
<i>Obrázek 6 a) kofein (32), b) rutin (33)</i> .....	24
<i>Obrázek 7 Kůže (vpravo) oddělená od ušního boltce</i> .....	27
<i>Obrázek 8 Přístroj Permeagear Fraction Collector FC33 (vlevo), detail na permeační cely (vpravo)</i> .....	28
<i>Obrázek 9 Kalibrační křivka kofeinu při vlnové délce 273 nm</i> .....	30
<i>Obrázek 10 Množství permeovaného kofeinu v jednotlivých frakcích</i> .....	31
<i>Obrázek 11 Kalibrační křivka rutinu při vlnové délce 353 nm</i> .....	31
<i>Obrázek 12 Rotační vakuová odparka Heidolph Hei-Vap</i> .....	32
<i>Obrázek 13 Kalibrační křivka avobenzonu při vlnové délce 358 nm</i> .....	32
<i>Obrázek 14 Kalibrační křivka oktinoxatu při vlnové délce 308 nm</i> .....	33