

ZKOUŠKA IN VITRO PENETRACE KŮŽE II.

Výsledek č. TH03010279 – V2

Číslo projektu: **TH03010279**

Název projektu: **In vitro kožní penetrace – optimalizace testovacích metod**

1. Účel

Účelem tohoto SOP je zajistit standardizaci postupu při provádění testu *in vitro* kožní penetrace (neradioaktivní metoda).

2. Definice, zkratky

BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin)
FR	Fyziologický roztok
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
VDC	Vertikální difúzní cely

3. Textová část

Text tohoto SOP byl vypracován v souladu s normou:

- ČSN EN ISO 10993-4 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví, Prosinec 2017

3.1. Úvod

Hlavní zdrojem metodiky popsané v této SOP byla metodika OECD 428 Skin absorption: *in vitro* Method

3.2 Princip metody

In vitro kožní penetrace je alternativní test toxicity, při kterém se sleduje prostup testované látky kožním modelem do receptorového média. V praxi je testovaná látka aplikována na povrch kožního modelu, který je umístěn mezi donorovou a receptorovou část vertikální difúzní cely (VDC). Testovaná látka proniká za daných podmínek kožním modelem do receptorového média. Receptorové médium je během pokusu průběžně v přesných časech vzorkováno a analyzováno na obsah testované látky. Výsledkem je absorpční profil, tj. množství difundované testované látky kožním modelem v závislosti na čase. Z absorpčního profilu jsou vypočteny difúzní parametry lag time a flux.

3.3 Pomůcky a zařízení

Termoblok HDT 1000, Copley Scientific (inv. č. 14235)

Vertikální difúzní cely (VDC) for skin, Copley Scientific

Teploměr TESTO 925 s povrchovou sondou (inv. č. 67282)

Analytické váhy Mettler Toledo XS205DU, s přesností navážky 0,01 mg (inv. č. 13837)

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK540 (inv. č. 65091)

Water purification system IWA 20iol (ultračistá voda (UPW), 18,2 M Ω /cm), Watek (inv. č. 62573)

Ultrazvuková lázeň RK540 (inv. č. 65091)

Injekční stříkačky a jehly

Nůžky, skalpel

Standardní laboratorní nádobí

V případě potřeby mohou být použity jiné ekvivalentní přístroje a zařízení vhodné k danému účelu.

3.4 Kožní model

Nespařená kůže ze zadní strany ušních boltců nebo z boků prasat, určených k porážce na jatkách. Popis materiálu, odběr, úprava a uchovávání je popsáno v metodice In vitro penetrace I.

3.5 Vertikální difúzní cely (VDC)

Vertikální difúzní cely se skládají z donorové a receptorové části. Mezi donorovou a receptorovou část je vkládán kožní model. Do donorové části je na kožní model aplikována testovaná látka. Testovaná látka může být aplikována rozpuštěná v donorovém médiu. Testovaná látka difunduje kožním modelem do receptorového média. Vzorky receptorového média jsou odebírány injekční stříkačkou s jehlou ramínkem na receptoru cely.



Obrázek 1: Vertikální difúzní cely se šroubením

3.6 Popis testu

Příprava cel před testováním

K provedení testu se připraví 10 cel. Před zahájením testu se vyříznou z kožního modelu terčíky o průměru cca 2 cm. Terčíky jsou vloženy mezi dva těsnící kroužky tak, aby kožní model dostatečně pokryl styčnou plochu mezi donorem a receptorem cely, ale aby nepřesahoval okolo kroužků. Těsnící kroužky s kožním modelem jsou umístěny do závitů donorové části cely. Donor je našroubován na receptorovou část. Poté je receptorová část cely naplněna receptovým médiem po vyznačenou rysku na ramínku. Při plnění cely již musí být v receptoru umístěno míchadlo. Receptorové médium je doplňováno injekční stříkačkou s jehlou tak, aby byla minimalizována tvorba bublin v receptoru. Médium musí být proto dostatečně odplyněno

T A Č R

v ultrazvukové lázni a při plnění cely je nutno dávat pozor na vznik vzduchových bublin v prostoru cely a na tvorbu bubliny pod kožním modelem. Ramínko cely se uzavře gumovou zátkou kvůli možnému odpařování média. Naplněné cely jsou umístěny do vyhřívaného bloku, kde je povrch kožního modelu temperován na 32 ± 1 °C. Teplota je kontrolována digitálním teploměrem s povrchovou sondou. Na vyhřívaném bloku je nastavena optimální rychlost míchání (600 rpm). Po vytemperování kožního modelu na požadovanou teplotu může být test zahájen.



Obrázek 2: Aparatura

Průběh testu

Na začátku pokusu bude aplikována testovaná látka ve stejné formě v jaké je pravděpodobná případná expozice člověka. Zvolené množství je aplikováno přímo na kožní model. Pokud se jedná o kapalnou formu, je nadávkovaný objem (kapka roztoku) rozprostřen po celé ploše krouživým pohybem cely. Testovaná látka je do každé cely aplikována v časovém rozmezí. Stejně časové rozmezí je dodržováno i při odběrech vzorků. Při odběru vzorku je do cely zavedena ramínkem jehla nasazena na injekční stříkačku. Jehla je zavedena vždy do přibližně stejného místa, do prostoru nad míchadlem ve středu cely. Aby byl pokaždé zajištěn odběr z přibližně stejného místa v cele, byla na každou jehlu vyznačena fixem ryska ve vzdálenosti přibližně 8 cm od hrotu jehly. Po tuto rysku je jehla ponořena při odběru do ramínka. Injekční stříkačkou je do vialky odebrán požadovaný objem vzorku. Ihned po odběru vzorku je do cely doplněno čisté receptorové médium po vyznačenou rysku na ramínku. Receptorové médium je doplňováno ramínkem cely pomocí injekční stříkačky s jehlou. Při odběru vzorku a doplňování receptorového média je nutné dávat pozor na vznik vzduchových bublin v médiu v cele. I malé vzduchové bubliny se mohou během míchání přesunout v médiu, a pokud se vyskytnou pod membránou, mohou mít vliv na difúzi testované

látky. Pokud se pod membránou vyskytne během testování bublina je nutno ji co nejdříve odstranit nakloněním cely tak, aby mohla být bublina vyloučena skrz ramínko. A poté doplnit receptorové médium po rýsku. Po ukončení pokusu jsou cely rozebrány, vyčištěny a usušeny.

Receptorové médium

Pro látky polárního charakteru je používán fyziologický roztok. U lipofilních látek je do fyziologického roztoku přidáván hovězí sérový albumin (5%), který podporuje rozpustnost lipofilní látky ve vodném roztoku. Použití jiného média musí být ověřeno a zdůvodněno. Před testováním musí být ověřena rozpustnost testované látky ve vybraném receptorovém médiu.

Aplikace testované látky

Testovaná látka se aplikuje v množství, které napodobuje expozici člověka v reálných podmínkách. Doporučuje se 1-5 mg/cm² pro pevné látky a více než 10 µl/cm² pro kapaliny. Testovaná látka by měla být aplikována ve stejné formě v jaké je možná případná expozice člověka. Pro každou koncentraci musí být použity nejméně čtyři kožní preparáty.

Negativní kontrola

Součástí testu je nejméně jedna negativní kontrola. Negativní kontrolou je cela s kožním modelem, na který se po zahájení testu aplikuje donorové médium bez přítomnosti testované látky. Z cely jsou odebírány vzorky ve stejných časových intervalech jako u ostatních cel a poté jsou vzorky analyzovány. Cílem negativní kontroly je ověřit, zda není testovaná látka přítomna v kožním modelu a zda se neuvolňuje do receptorového média.

Expozice a časové schéma odběrů

Doba expozice může trvat 24 hodin a nebo může být zkrácena. Zkrácena může být z důvodu kratší expozice člověka v reálných podmínkách nebo u látek rychle penetrujících kůží. Frekvence odběrů vzorků je volena podle vlastností testované látky. Ke zjištění přesného časového schématu odběrů může být proveden předtest s jednou koncentrací a nejméně čtyřmi kožními modely. Průběh předtestu je stejný jako samotný test. Časové schéma může být také zvoleno podle již známých penetračních vlastností. Frekvence odběrů vzorků by měla poskytnout graficky vyjádřenou rychlost průniku látky kožním modelem – absorpční

Odběry vzorků

Odběry vzorků jsou prováděny v intervalech dle časového schématu. Je proveden odběr 0,5 ml receptorového média pro následnou analýzu a receptorová část cely je ihned doplněna 0,5 ml čistého receptorového média. Při odběru a doplňování je nutné dbát, aby v receptoru nevznikaly nežádoucí vzduchové bubliny, které by mohly ovlivnit penetraci.

Teplota

Pasivní difúze, tedy prostup látky kůží, je ovlivněna teplotou. Proto by měla být teplota kožního modelu během pokusu udržována pomocí termobloku na 32°C ± 1, jako je běžná teplota kůže u člověka. Teplota kožního modelu se kontroluje před zahájením pokusu digitálním teploměrem s povrchovou sondou a je zaznamenána.

Analýza

Pro každý testovaný analyt je předem vyvinuta a validována HPLC metoda.

Vzorky odebrané ve vialkách se analyzují touto metodou a koncentrace se vyhodnocuje z rovnice regrese kalibrační křivky v jednotkách mg/l.

Data

Výstupy z HPLC analýzy tj. koncentrace látky v receptorové tekutině odebrané v určitých časových intervalech jsou pak vloženy do excelovské tabulky (ukázka v Příloze 4 tohoto SOP). Absorpce kůží je zde vyjádřena pouze pomocí údajů o receptorové kapalině. Není zjišťováno množství v různých vrstvách kůže, ale je zdokumentována absorpční rychlost (flux) a doba, kdy začíná látka procházet.

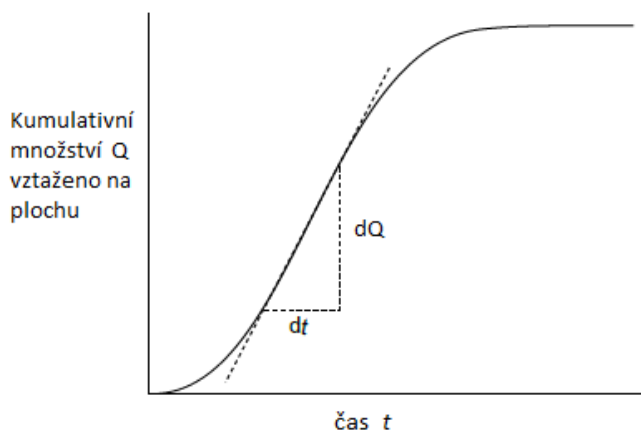
Vyhodnocení

Vyhodnocená koncentrace vzorků je přepočtena na **kumulativní množství**. Parametr kumulativní množství vyjadřuje celkové prošlé množství testované látky v daném čase a počítá s korekcí úbytku látky v cele při odběrech. Kumulativní množství je vztaženo na plochu kožního modelu a počítá se dle rovnice (1):

$$Q_x = \frac{1}{S} \{ (V_{\text{cela}} \cdot c_x) + V_{\text{odb}} \sum_{i=1}^{x-1} c_i \} \quad (1)$$

kde Q_x [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] je kumulativní množství v daném odběru x , V_{cela} [l] je objem difuzní cely, V_{odb} [l] je objem jednoho odběru receptorového média z difuzní cely, c_x [$\mu\text{g}/\text{l}$] je koncentrace látky v daném odběru (vypočtena z rovnice regrese kalibrační přímky), c_i [$\mu\text{g}/\text{l}$] je koncentrace látky v prvním odběru receptorového média a S [cm^2] je styčná plocha kožního modelu a donoru (plocha otvoru donorové části cely).

Ze závislosti kumulativního množství na čase je graficky sestrojen **absorpční profil** (Obrázek 3).



Obrázek 3: Ukázka absorpčního profilu

Z absorpčního profilu lze zjistit parametry lag time a flux.

Zpětnou extrapolací lineární části křivky lze zjistit z osy x parametr **lag time**. Lag time (doba zpoždění) je hodnota času a udává, kdy začne v receptorovém médiu exponenciálně růst koncentrace látky prošlé skrz kožní model.

Parametr *flux* (ustálený tok) udává maximální absorpční rychlost dosaženou v určitém časovém intervalu (lineární část absorpčního profilu). Uvádí se v jednotkách $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Parametry lag time a flux se získávají ze softwaru SAMPA.

Výsledky studie jsou zpracovány v programu Excel.

4. Dokumentace

Závěrečná zpráva bude obsahovat informace:

- 1/ o testované látce, jejich vlastnostech a rozpustnosti
- 2/ o zkušebních podmínkách testu (kožní model jeho zdroj, použité cely, receptorová kapalina, detaily aplikace a testovaná dávka analytu, doba expozice, frekvence odběrů)
- 3/ o HPLC metodě stanovení (přístroj, limit detekce a výsledky validace)

Výsledky stanovení analytu s obsahy jednotlivých cel v mg/L formou tabulky a absorpční profil s vypočtenými hodnotami flux a lag time.

Diskuze výsledků.

5. Literatura

1. OECD Test Guideline for the Testing of Chemicals, Skin Absorption: in vitro Method No. 428, Adopted 13th April 2004
2. SOP M/121/1 Kožní penetrace I. -*in vitro*, VUOS – CETA, 2021
3. Method EU - B. 45 Skin Absorption: *in vitro* Method, Adopted 31st May 2008, Council Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)
4. BEZROUK, Aleš, Zdeněk FIALA, Lenka KOTINGOVÁ, Iva Selke KRULICHOVÁ, Monika KOPEČNÁ a Kateřina VÁVROVÁ. SAMPA: A free software tool for skin and membrane permeation data analysis. *Toxicology in Vitro* [online]. 2017, 44, 361-371 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.07.017. ISSN 08872333
5. Manuál k testovacímu systému Copley Scientific (Termoblok HDT 1000, Copley Scientific + Vertikální difúzní cely (VDC) for skin, Copley Scientific)