

# **Stanovení transdermální absorpce kosmetických emulzí *in vitro***

Bc. Lenka Vlachynská

---

Diplomová práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Vlachynská**  
Osobní číslo: **T15325**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení transdermální absorpce kosmetických emulzí in vitro**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. V teoretické části zpracujete literární rešerši na zadané téma.
2. Charakterizujte kosmetické emulze a zaměřte se na emulze stabilizované částicemi (Pickeringovy emulze) s obsahem lipofilních bioaktivních látek.
3. Věnujte se rovněž problematice transdermální absorpce kosmetických přípravků a uveďte postup pro její stanovení.

### II. Praktická část

1. V praktické části připravte Pickeringovy emulze s obsahem bioaktivních lipofilních látek. Připravené vzorky charakterizujte vhodnými analytickými metodami.
2. Proveďte test transdermální absorpce připravených emulzí in vitro s využitím Franzových difuzních komůrek.
3. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. TADROS, Tharwat F. Emulsion science and technology. Weinheim: Wiley-VCH, c2009. ISBN 3527325255.
2. FRELICHOWSKA, Justyna et al. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. International Journal of Pharmaceutics. 2009, 371(1-2), s. 56-63. ISSN 03785173.
3. MARTO, Joana et al. Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. Expert Opinion on Drug Delivery. 2016, 13(8), s. 1093-1107. ISSN 1742-5247.
4. BARTOŠOVÁ, Lucie a Jiří BAJGAR. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. Current Medicinal Chemistry. 2012, 19(27), s. 4671-4677. ISSN 09298673.
5. KOTINGOVÁ, Lenka et al. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. Chemické listy: Časopis pro průmysl chemický. Praha: Česká společnost chemická, 2009, 103(7), s. 533-539. ISSN 0009-2770.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

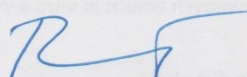
Datum zadání diplomové práce:

**3. února 2017**

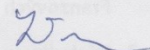
Termín odevzdání diplomové práce:

**17. května 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



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

Příjmení a jméno: Vlachynská Lenka

Obor: Technologie tuků,  
detergentů a kosmetiky

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....15.5.2017.....

.....  


<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá stanovením transdermální absorpce kosmetických emulzí. V teoretické části je popsán postup pro stanovení transdermální absorpce metodou *in vitro*, jsou zde obecně charakterizovány kosmetické emulze a podrobněji pak emulze stabilizované částicemi (Pickeringovy emulze). Praktická část je věnována přípravě Pickeringových emulzí s obsahem limonenu, cinnamaldehydu a eugenolu, které jsou stabilizovány nanokrystalickou a mikrofibrilární celulórou. Emulze jsou charakterizovány pomocí stanovení velikosti částic a použity pro testování transdermální absorpce metodou *in vitro* s využitím Franzových difuzních komůrek. Množství bioaktivních lipofilních látek v jednotlivých vrstvách kůže je stanoveno pomocí HPLC.

Klíčová slova: transdermální absorpce, *in vitro* testování, Pickeringovy emulze, stabilizace

## **ABSTRACT**

Diploma thesis deals with determination of transdermal absorption of cosmetic emulsions. In the theoretical part of the thesis a procedure for determining transdermal absorption by *in vitro* method is described, cosmetic emulsions are characterized, and Pickering emulsions are introduced. The experimental part is focused on the preparation of Pickering emulsions containing limonene, cinnamaldehyde and eugenol, which all are stabilized either by nanocrystalline and microfibrillar cellulose. The emulsions are characterized *via* determination of their particle sizes and tested with respect to their transdermal absorption by *in vitro* method using Franz diffusion cells. The amount of bioactive lipophilic substances in the individual layers of the skin is determined by HPLC.

Keywords: transdermal absorption, *in vitro* testing, Pickering emulsion, stabilization

Chtěla bych poděkovat vedoucí své diplomové práce doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. nejen za skvělé vedení, pomoc a ochotu při vyhledávání informací, zpracování výsledků a řešení problémů, jež se během zpracování vyskytly, ale i za vstřícnost a trpělivost během celé naší spolupráce. Poděkování patří rovněž i Romainu Bordesovi, Ph.D. za přípravu emulzí a doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. a jeho týmu za provedení testů cytotoxicity. Další poděkování patří paní laborantce Lence Plechačové a doktorandkám Ing. Lucii Pindřákové a Ing. Veronice Mikulcové za ochotu a účinnou pomoc s přípravami a provedením experimentální části práce. Konečně bych ráda poděkovala projektu IGA/CPS/2017/001 za umožnění realizace experimentální části práce.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 KŮŽE</b> .....	<b>13</b>
1.1 EPIDERMIS.....	13
1.1.1 <i>Stratum corneum (SC)</i> .....	13
1.1.2 Viabilní část .....	14
1.2 DERMIS .....	15
1.3 HYPODERMIS.....	15
<b>2 TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE</b> .....	<b>16</b>
2.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCI.....	18
2.1.1 Druh kůže .....	18
2.1.2 Věk, pohlaví, etnický původ .....	18
2.1.3 Místo odběru .....	19
2.1.4 Stav kůže .....	19
2.1.5 Teplota kůže .....	19
2.1.6 Hydratace .....	19
2.1.7 Způsob aplikace a typ nosiče .....	19
2.2 METODY TESTOVÁNÍ PŘENOSU CHEMICKÝCH LÁTEK KŮŽÍ .....	20
2.2.1 Testování <i>in vitro</i> .....	20
2.2.1.1 Difuzní komůrky.....	20
2.2.1.2 Receptorová kapalina.....	22
2.2.1.3 Příprava kůže .....	22
2.2.1.4 Testovaná látka .....	23
2.2.1.5 Rozpouštědlo .....	24
2.2.1.6 Aplikace testované látky.....	24
2.2.1.7 Průběh testování.....	24
2.2.1.8 Zpracování výsledků.....	25
2.2.2 Testování <i>in vivo</i> .....	25
<b>3 CYTOTOXICITA</b> .....	<b>27</b>
3.1 TESTOVÁNÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK.....	27
3.1.1 Test s neutrální červení .....	27
3.1.2 Test s trypanovou modří.....	28
3.1.3 Kolorimetrické testy.....	28
<b>4 EMULZE</b> .....	<b>29</b>
4.1 KLASIFIKACE EMULZÍ.....	29
4.1.1 Podle polarity disperzního podílu a prostředí (Obr. 7): .....	29
4.1.2 Podle koncentrace disperzního podílu (Obr. 8): .....	30
4.1.3 Podle velikosti rozptýlených částic:.....	30
4.2 STABILITA EMULZÍ .....	32
4.2.1 Stabilizace elektrickou dvojvrstvou .....	32
4.2.2 Stabilizace pomocí surfaktantu .....	32
4.2.3 Stérická stabilizace.....	33
4.2.4 Stabilizace pomocí deplece .....	33
4.2.5 Stabilizace hydratací .....	33



<b>5</b>	<b>PICKERINGOVY EMULZE.....</b>	<b>34</b>
5.1	OBEČNÁ CHARAKTERISTIKA.....	34
5.2	FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI .....	34
5.3	BIOPOLYMERY STABILIZUJÍCÍ PICKERINGOVY EMULZE .....	35
5.3.1	Lipidové krystaly .....	35
5.3.2	Polysacharidy .....	36
5.3.2.1	Škrobové granule a granule modifikovaného škrobu .....	36
5.3.2.2	Chitin a chitosan .....	36
5.3.2.3	Celulóza .....	36
5.3.3	Proteiny .....	38
5.3.4	Flavonoidy.....	38
5.3.5	Vosky .....	38
<b>6</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>43</b>
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>45</b>
8.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	45
8.2	CHEMIKÁLIE A ROZTOKY .....	45
8.3	BUNĚČNÉ LINIE .....	46
8.4	PŘÍPRAVA EMULZÍ .....	46
8.5	CHARAKTERIZACE EMULZÍ .....	47
8.6	STANOVENÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE METODOU <i>IN VITRO</i> .....	48
8.6.1	Biologický materiál .....	48
8.6.2	Aparatura .....	49
8.6.3	Nanášení testovaných vzorků .....	50
8.6.4	Zpracování kůže .....	50
8.6.5	Analýza vzorků .....	51
8.7	STANOVENÍ CYTOTOXICITY .....	53
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>54</b>
9.1	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE EMULZÍ .....	54
9.2	HPLC ANALÝZA .....	58
9.3	TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE .....	59
9.3.1	Transepidermální ztráta vody (TEWL) .....	59
9.3.2	Transdermální absorpce cinnamaldehydu a jeho emulzí .....	59
9.3.2.1	Porovnání transdermální absorpce cinnamaldehydu .....	65
9.3.3	Transdermální absorpce limonenu a jeho emulzí.....	67
9.3.3.1	Porovnání transdermální absorpce limonenu .....	72
9.3.4	Transdermální absorpce eugenolu a jeho emulzí .....	75
9.3.4.1	Porovnání transdermální absorpce eugenolu .....	80
9.4	CYTOTOXICITA EMULZÍ .....	82
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>85</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>87</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>96</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>98</b>

<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>100</b>
----------------------------	------------

## ÚVOD

Lidská kůže patří mezi největší orgány lidského těla s mnoha funkcemi, z nichž nejdůležitější je funkce ochranná. Je složená z několika vrstev a díky tomu tvoří účinnou bariéru, která odděluje vnitřní prostředí organismu od prostředí vnějšího. Dermální expozice představuje významnou cestu vstupu exogenních látek do organismu.

Transdermální absorpce látek závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech a struktuře. Vybrané látky s různou chemickou strukturou mají, díky interakci s lipidy kůže, schopnost snížit ochrannou funkci kožní bariéry. Takové látky se nazývají enhancery (urychlovače) transdermální absorpce, a do této skupiny se mimo jiné řadí i esenciální oleje a jejich složky, jež jsou předmětem zkoumání této práce.

Pickeringovy emulze jsou součástí řady kosmetických a farmaceutických přípravků, neboť jsou velmi dobře snášeny pokožkou. To je způsobeno nepřítomností surfaktantů, jež jsou používány jako stabilizátory klasických emulzí. Pickeringovy emulze jsou stabilizovány pomocí pevných částic. K této stabilizaci se velmi často používají biokompatibilní a biodegradabilní částice z přírodních, obnovitelných zdrojů, jako jsou např. celulózoové částice.

Vzhledem k dermatologickému využití Pickeringových emulzí je důležité studovat, jak látky, jež jsou součástí těchto emulzí, pronikají do pokožky. Diplomová práce se touto problematikou zabývá a soustřeďuje se na stanovení transdermální absorpce metodou *in vitro*, jež je zde podrobně popsána. Dále jsou v práci charakterizovány kosmetické emulze a emulze stabilizované částicemi (Pickeringovy emulze). Praktická část práce je pak zaměřena na přípravu Pickeringových emulzí, obsahujících složky esenciálních olejů (limonen, cinnamaldehyd a eugenol), které jsou stabilizovány nanokrystalickou a mikro-fibrilární celulózou. Připravené emulze jsou charakterizovány stanovením velikosti částic. U připravených emulzí i jejich olejových složek je dále testována transdermální absorpce metodou *in vitro* s využitím Franzových difuzních komůrek, a množství bioaktivních lipofilních látek v jednotlivých vrstvách kůže je stanoveno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V pilotní studii je rovněž stanovena cytotoxicita vybraných vzorků.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 KŮŽE

Lidská kůže je největším orgánem těla, který zastává řadu funkcí, z nichž nejdůležitější je tvorba bariéry mezi vnitřním a vnějším prostředím. Kůže má řadu důležitých funkcí, z nichž je možno jmenovat např. regulaci prostupu vody a elektrolytů, či ochranu před mikroorganismy, UV zářením a působením toxických látek. U dospělého člověka tvoří asi 16 % tělesné hmotnosti a dosahuje plochy až 2 m<sup>2</sup> (průměrně 1,6–1,8 m<sup>2</sup>). Tloušťka kůže leží v rozmezí od 0,5 mm do 4 mm a závisí na tom, v jakém místě těla se kůže nachází. Nejtenčí je na očních víčkách a nejsilnější na zádech [1, s. 629], [2, s. 156].

Anatomicky se kůže skládá z několika vrstev, od povrchu je to *epidermis* (pokožka), následuje *dermis* (škára) a nejhluběji je uložena *hypodermis* (podkoží nebo podkožní tuková tkáň) [1, s. 629], [1, s. 533].

## 1.1 Epidermis

Pokožka (*epidermis*) neobsahuje cévy a lze ji dále členit na dvě základní vrstvy, a to zrohovatělou *stratum corneum* (SC), tvořenou odumřelými buňkami, a viabilní část, tvořenou živými buňkami (Obr. 1) [2, s. 156], [4, s. 5].

Hlavními buňkami pokožky jsou keratinocyty, kromě kterých jsou zde přítomny i Langerhansovy buňky, Merkelovy buňky a melanocyty (produkující pigment melanin). Tyto buňky však nejsou pro bariérovou funkci pokožky důležité [1, s. 629].

### 1.1.1 *Stratum corneum* (SC)

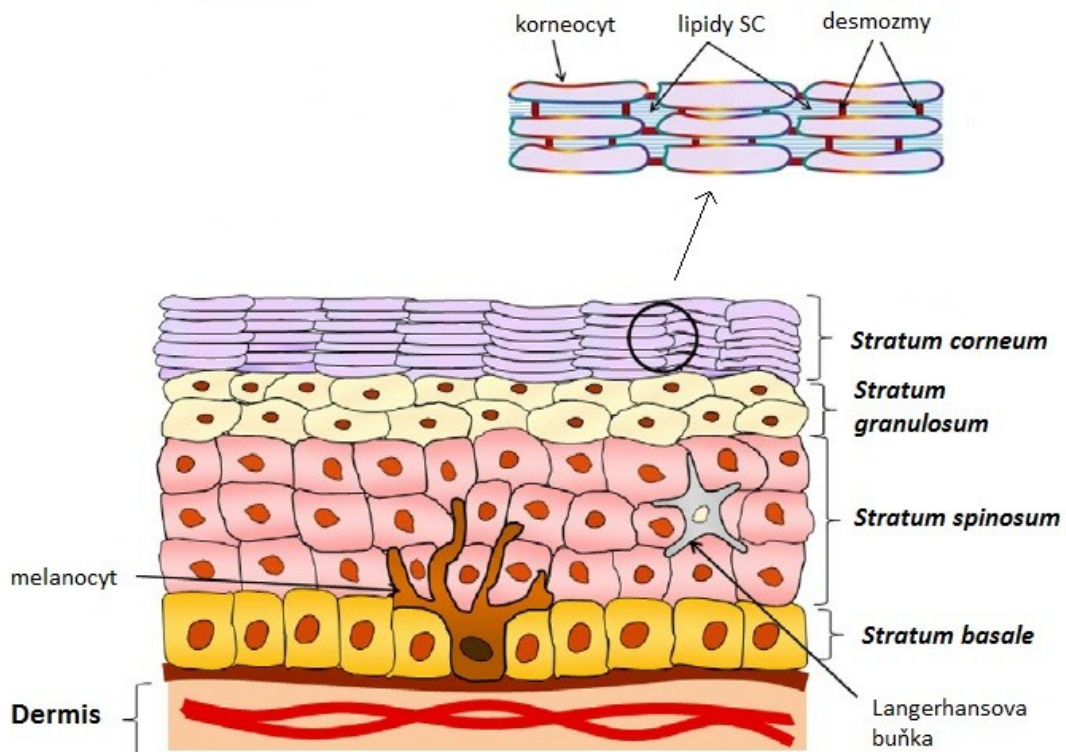
Tloušťka SC bývá obvykle 10–25 μm, s výjimkou dlaní a plosek nohou. Je tvořena několika vrstvami plochých bezjaderných buněk (korneocyty), vyplněných keratinem a pevně obklopených lipidovou matrix. Takové uspořádání se nazývá „cihly a malta“. Soudržnost buněk SC navíc zajišťují desmozomy. Lipidová matrix představuje přibližně 20 % objemu SC a je tvořena ceramidy (9 typů), cholesterolem, mastnými kyselinami a dalšími látkami, z nichž nejdůležitější je cholesterol sulfát [3, s. 533], [4, s. 5], [5, s. 55].

Pro vstup látek do organismu je důležitý rozdíl mezi charakterem hydrofobní rohové vrstvy a charakterem ostatních hydrofilních vrstev pokožky. Pro bariérovou funkci SC má největší význam složení mezibuněčné matrix, jež je rovnoměrně přítomna v celém SC a prostupující látky musí touto hmotou projít [3, s. 534], [5, s. 55].

### 1.1.2 Viabilní část

Viabilní část *epidermis* je tvořena několika vrstvami. Pod *SC* se nachází vrstva světlých buněk (*stratum lucidum*), tvořená plochými bezjadernými buňkami; tato vrstva se však nachází pouze na dlaních a ploskách nohou. Další v pořadí je vrstva zrnitá (*stratum granulosum*), tvořená plochými buňkami, v nichž se nachází plochá jádra vyplněná zrny keratohyalinu (prekurzor keratinu). Následuje vrstva ostnitá (*stratum spinosum*), tvořená polyedrickými buňkami. Uvnitř buněk jsou jádra a všechny buněčné orgány, a prostor mezi buňkami je vyplněn tkáňovým mokem. Nejspodnější vrstvou je tzv. bazální vrstva (*stratum basale*), tvořená cylindrickými buňkami. Cylindrické buňky zde vytváří zvlněnou bazální membránu, která odděluje pokožku od škáry. Tyto buňky obsahují jádro a buněčné orgány a mitoticky se dělí [3, s. 534], [4, s. 5].

V bazální vrstvě na hranici *epidermis* a *dermis* se z kmenových buněk vytváří buňky (keratinocyty), které postupují ke kožnímu povrchu, a přitom procházejí různými stádii diferenciace. Při tomto procesu buňky postupně ztrácí jádro, zplošťují se a vypouští lipidy do mezibuněčného prostoru, proces končí zrohovatěním buněk, které pak tvoří *SC*. Celý proces trvá přibližně 28 dní a nazývá se keratinizace [4, s. 5], [5, s. 55].



Obr. 1: Stavba epidermis [6, s. 135].

## 1.2 Dermis

Škára je tvořena vazivovou tkání (složená z vazivových buněk – fibroblastů), pojivovými vlákny (kolagenní, elastická a retikulární) a mezibuněčnou hmotou, v níž se nachází vlasové folikuly, mazové a potní žlázy, krevní a lymfatické cévy a nervová zakončení [2, s. 534], [4, s. 5].

Anatomicky se škára skládá ze dvou částí:

- *stratum papillare* (povrchová vrstva) – obsahuje větší množství vazivových buněk a hustou síť krevních kapilár, které zasahují do papil koria, s nimiž vystupují téměř k povrchu kůže;
- *stratum reticulare* (hlubší vrstva) – nachází se na přechodu mezi škárou a podkožím a obsahuje větší cévní pleteně. Vlnitý průběh snopců kolagenních vláken, která jsou zde přítomna, umožňuje tažnost kůže, zatímco elastická vlákna navracejí kůži po namáhání do původního stavu [1, s. 641], [4, s. 4].

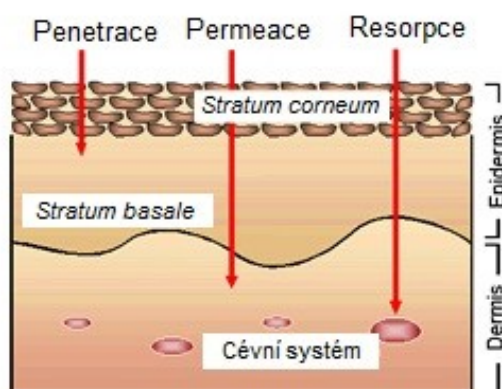
## 1.3 Hypodermis

Mezi škárou a podkožím není ostrá hranice. Podkoží je, stejně jako škára, tvořeno vazivem a obsahuje velké množství tukových buněk, cévní a nervové pleteně. Podkožní tuková tkáň slouží jako zdroj zásobních látek, při termoregulaci má funkci ochrannou a izolační, a na některých místech těla má i funkci mechanické ochrany (tukové výplně na dlaních a chodidlech). Nejsilnější tukový polštář bývá na břiše, hýždích a na vnitřní straně stehen, naopak zcela chybí na očních víčkách, ušních boltcích a hřbetu nosu [1, s. 643], [5, s. 55].

## 2 TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE

Perkutánní/dermální absorpce je proces, pomocí kterého procházejí látky přes kůži do systémového oběhu. Zahrnuje tři kroky (Obr. 2):

- penetraci – vstup látky do určité vrstvy;
- permeaci – přestup látky z jedné vrstvy do jiné;
- resorpci – vstup látky do lymfy nebo místního cévního systému a odtud až do systémového oběhu [7, s. 4], [8, s. 8].



Obr. 2: Transdermální prostup látek [9].

Transdermální absorpcí mohou do organismu proniknout látky ze životního či pracovního prostředí, chemické látky, kosmetické přípravky a farmaceutické výrobky, jejichž působení je pokožka vystavena [8, s. 1].

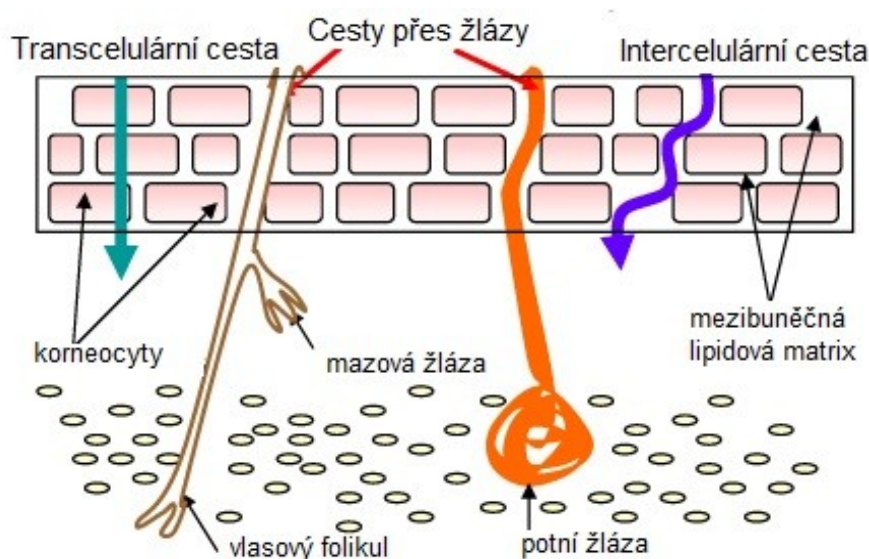
Chemické látky mohou do vnitřního prostředí organismu pronikat pěti hlavními cestami (Obr. 3):

- transcelulární cestou – tj. přes těla buněk SC a buněk ostatních vrstev pokožky;
- intercelulární cestou – tj. mezibuněčnými prostory;
- vlasovými folikuly;
- mazovými žlázami;
- vývody potních žláz [8, s. 17], [10, s. 107].

Většina látek (zejména lipofilní povahy) prochází intercelulární cestou přenosu. Menší množství látek (zejména hydrofilní povahy) pak prochází transcelulární cestou, která je pro látky nevýhodná vzhledem k nutnosti procházet nejen přes hydrofilní vnitřní prostředí buněk, ale i přes hydrofobní intercelulární prostor. Zbývající cesty přechodu látek



mají pro celkovou dermální absorpci jen okrajový význam; výjimku tvoří expozice vlasaté části hlavy a stavy spojené s onemocněním hypertrichózou. V těchto případech je hustota a velikost vlasových folikulů mnohem větší než v jiných částech pokožky. Nově se mezi cesty transportu řadí ještě cesta šestá – přes póry v lipidové dvojvrstvě extracelulárního prostoru SC. Předpokládá se, že jde o hlavní cestu prostupu hydrofilních látek, ale přímé objektivní důkazy existence tohoto způsobu průchodu látek nebyly zatím podány [8, s. 17], [11, s. 4672], [12, s. 206], [13, s. 78], [14, s. 46].



Obr. 3: Cesty průniku látek [15, s. 20].

Průnik látek kůží se děje pasivní difuzí na základě rozdílného koncentračního gradientu látky na obou stranách penetrační membrány. Podle některých autorů se při průniku látek do organismu vedle pasivní difuze částečně uplatňuje i vliv „nasávání“ látky, který vyvolává podtlak vznikající při odvádění tkáňové tekutiny a krve ze škýry [3, s. 534], [11, s. 4672].

Průnik chemických látek kůží probíhá v několika krocích, ale jejich označení se v různých odborných publikacích liší. Diembeck a kol. dělí průnik chemických látek na adsorpci a absorpci. Adsorpce udává množství látky, jež se váže ve SC a spolu s jejími odlupujícími se buňkami je odstraňováno, nedostává se tedy do hlubších vrstev pokožky ani do systémové cirkulace. Absorpce udává množství látky, jež se dostává do hlubších vrstev pokožky a do škýry, a díky kontaktu mezibuněčného tkáňového moku a cév dále proniká do organismu [16, s. 192]. OECD a následně i WHO nověji označují průnik látek do organismu jako globální termín, který popisuje celou cestu přenosu těchto látek z povrchu kůže do krev-

ních nebo lymfatických cév organismu. Z tohoto důvodu dále rozdělují absorpci na penetraci, permeaci a resorpci, jež byly popsány výše [3, s. 534]. Nejnovější dělení přenosu látek uvádí Selzer a kol. Podle tohoto dělení termín permeace představuje množství látky prošlé přes testovací bariéru, penetrace představuje množství látky v kůži, a součet obou hodnot je označován jako „uptake“ (příjem) [17, s. 281].

## **2.1 Faktory ovlivňující transdermální absorpci**

Transdermální absorpce je ovlivněna fyzikálně-chemickými vlastnostmi testované látky a donorové tekutiny, v níž je látka rozpuštěna; interakcí mezi testovanou látkou/donorovou tekutinou a kůží; vlastnostmi kůže; dávkou a objemem testované látky; a délkou expozice [8, s. 17].

### **2.1.1 Druh kůže**

Transdermální absorpci významně ovlivňuje druh použité kůže. U laboratorních zvířat je kůže, díky odlišné struktuře, pro většinu chemických látek více propustná než kůže lidská. Důležitými faktory jsou obsah lipidů, tloušťka rohové vrstvy a větší počet žlázových vývodů na jednotku plochy. Lidské kůži je strukturou nejpodobnější kůže prasat a opic [8, s. 17–18].

### **2.1.2 Věk, pohlaví, etnický původ**

V důsledku stárnutí dochází ke změnám ve struktuře kůže. Dochází ke ztenčení epidermis a snížení aktivity mazových žláz, což vede k poklesu množství lipidů na povrchu kůže. Množství kožních lipidů se mění v závislosti na ročním období, v zimě je jejich obsah prakticky vyčerpán ve srovnání s jarem nebo létem. Složení lipidů je odlišné u jednotlivých etnických skupin a existují rovněž rozdíly ve struktuře kůže mužů a žen. Muži mají v kůži menší keratinocyty, ale větší množství mazových a potních žláz, které jsou aktivnější. Přesto však rozdílnost v propustnosti kůže u obou pohlaví potvrzena nebyla. Obecně lze říci, že bez ohledu na podmínky prostředí, pohlaví a etnický původ, jsou bariérové funkce kůže velmi podobné. Při měření transdermální absorpce kyseliny benzoové, kofeinu a kyseliny acetylsalicylové nebyly prokázány žádné rozdíly mezi kůží Asiata, Afričana a Evropana. Je však nutné říci, že všechny testované látky byly hydrofilní [8, s. 18], [19, s. 102], [20, s. 7].

### 2.1.3 Místo odběru

Struktura kůže se neliší jen mezi jednotlivci, ale i v jednotlivých anatomických oblastech každého jedince. Transdermální absorpce klesá v pořadí genitálie, hlava a krk, trup, ruce a nohy. Existují však i rozdíly u míst se stejnou tloušťkou *SC*, v tomto případě klesá absorpce v pořadí nasolabiální oblast, oblast kolem úst, brada, nos, líce, čelo, krk, předloktí [12, s. 211], [19, s. 104].

### 2.1.4 Stav kůže

Stav kůže může významně ovlivnit penetraci a permeaci látek, zvláště když je narušena bariérová funkce kůže. Propustnost kůže může být zvýšena fyzikálními faktory (okolní prostředí, sluneční záření a mechanické poškození), chemickými faktory (rozpouštědla, detergenty, kyseliny a alkálie), a při patologických stavech kůže (psoriáza, atopický ekzém, kožní infekce). Lipidové vrstvy kůže mohou být rovněž narušeny polárními a nepolárními rozpouštědly, což vede ke snížení bariérové funkce kůže [8, s. 19], [19, s. 104].

### 2.1.5 Teplota kůže

Zvýšená teplota kůže zvyšuje průnik látek kůží, a to přímým ovlivněním procesu difúze. Teplota může mít také vliv na krystalickou strukturu lipidové dvojvrstvy *SC*, a na průtok krve kůží. Zahřátí kůže vede ke zvýšenému průtoku krve kůží, čímž dochází ke zvýšené penetraci látek kůží [8, s. 19–20], [21, s. 273].

### 2.1.6 Hydratace

*SC* obvykle obsahuje 5–20 % vody, při hydrataci až 50 %. Vyšší úroveň hydratace způsobuje bobtnání s následným rozvolněním kompaktní struktury *SC*, což vede k lepšímu pronikání mnoha látek. Avšak zvýšení hydratace kůže vlivem okluze může mít opačný účinek, např. u hydrofilní sloučeniny kortizolu [12, s. 212], [17, s. 285].

### 2.1.7 Způsob aplikace a typ nosiče

Rozpustnost chemických látek v různých typech rozpouštědel se většinou liší. Díky tomu je i penetrace těchto látek kůží rozdílná, dokonce i při aplikaci stejného množství látky. Použité nosiče mají schopnost zvyšovat nebo snižovat rozpustnost, případně difúzi látek ve *SC*, a tím zvyšují nebo snižují jejich průnik. Bylo zjištěno, že vyšší podíl vody v nosiči, bez ohledu na množství organické fáze, zvyšuje transdermální absorpci kyseliny benzoové.

Například již méně než 10 % vody v roztoku 2-Butoxyethanolu způsobí až čtyřnásobný průnik kyseliny [22, s. 82].

## 2.2 Metody testování přenosu chemických látek kůží

Obecně lze k testování přenosu chemických látek kůží použít metody *in vivo* na člověku nebo zvířeti, *in vitro* na kůži lidské, zvířecí, uměle vytvořené nebo na membráně, a modelování absorpce *in silico*. Při testech na zvířatech bylo prokázáno, že absorpce látek přes kožní membránu *in vitro* bývá obvykle vyšší než absorpce *in vivo* [3, s. 534], [18, s. 421].

### 2.2.1 Testování *in vitro*

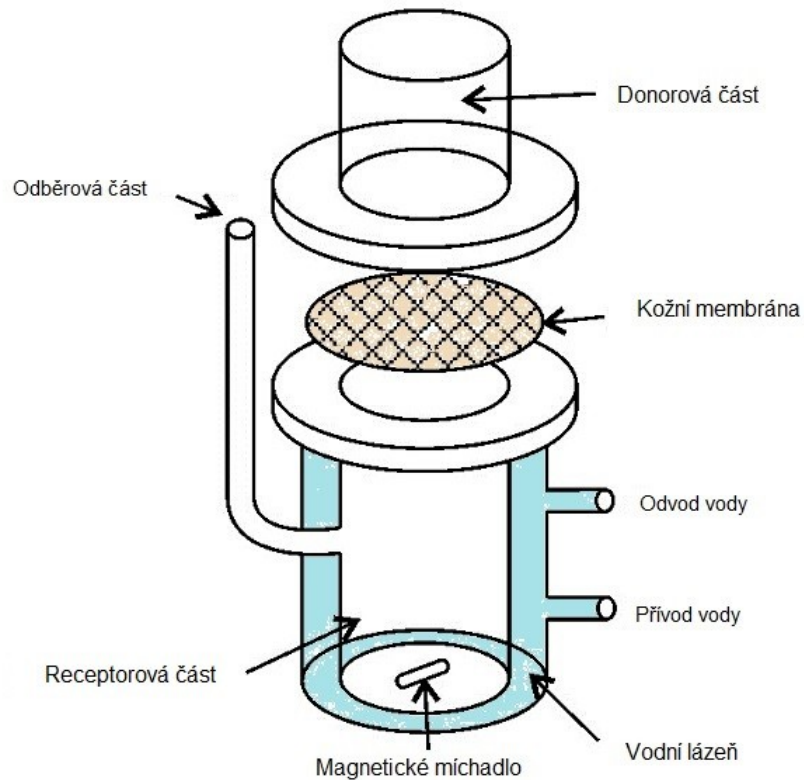
Metody *in vitro* slouží k testování průniku látek do kůže a jejich následnému proniknutí až do krevního řečiště. K měření penetrace a permeace látek může být využívána neživotaschopná kůže, nebo kůže čerstvá, metabolicky aktivní, s pomocí které je možné stanovit současně průnik látek a metabolismus kůže. Výhodou metod *in vitro* oproti testování *in vivo* je úspora času a nákladů, lepší reprodukovatelnost výsledků a omezené kolísání parametrů testování. Další výhodou je také použití kůže jak lidské, tak i jiných živočišných druhů [11, s. 4673].

#### 2.2.1.1 Difuzní komůrky

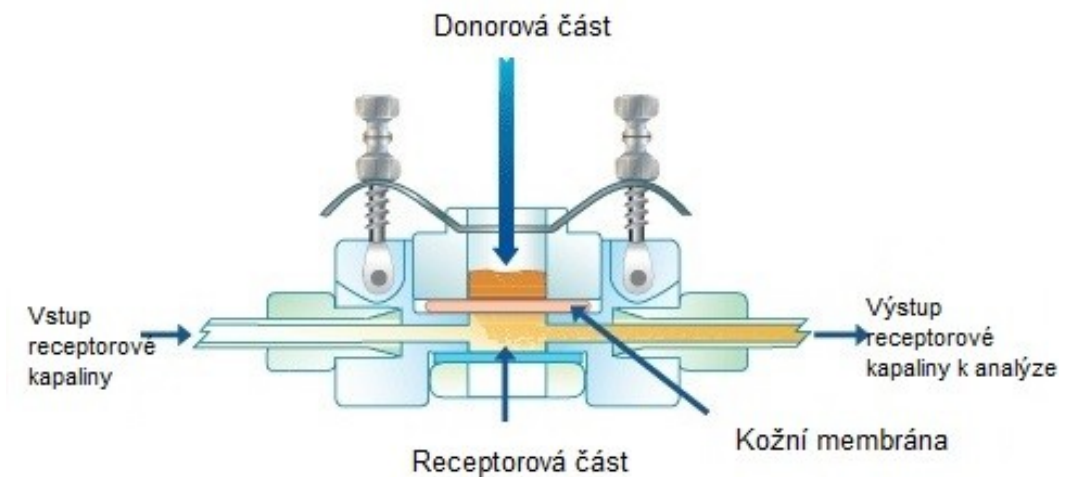
Stanovení transdermální absorpce se provádí za použití difuzních komůrek, které jsou vyrobeny z inertních materiálů (sklo, teflon), a skládají se ze dvou částí. Horní část je označována jako donorová a spodní část jako receptorová, jež je naplněna receptorovou kapalinou. Mezi obě části se pak vkládá kůže pokožkou nahoru. Směr penetrace přes difuzní komůrky může být vertikální/svislý nebo horizontální/side-by-side. V praxi však převládá směr vertikální [3, s. 536], [7, s. 6], [11, s. 4673].

Existují dva základní typy difuzních komůrek:

- statická vertikální difuzní komůrka – bývá označována jako Franzova komůrka/cela (Obr. 4), v níž musí být receptorová kapalina neustále míchána a manuálně odebírána pro analýzu;
- průtoková vertikální difuzní komůrka (Obr. 5) – receptorová kapalina je kontinuálně odstraňována pomocí peristaltické pumpy. Tento typ je vhodnější pro studium metabolismu látek v kůži, jeho nevýhodou je však přístrojová náročnost [3, s. 536].



Obr. 4: Franzova komůrka [23].



Obr. 5: Průtoková vertikální difuzní komůrka [24].

I přes rozdílnou konstrukci obou komůrek nebyly ve srovnávacích studiích prokázány rozdíly v měření propustnosti kůže [3, s. 536].

### 2.2.1.2 Receptorová kapalina

Receptorová část komůrky je naplněna receptorovou kapalinou, která je v průběhu testování neustále míchána. Její teplota se udržuje na hodnotě  $32 \pm 1$  °C, což je fyziologická teplota kožního povrchu. Složení receptorové kapaliny nesmí omezovat rozsah difúze testované látky, musí být tedy zaručena její rozpustnost a stabilita v receptorové kapalině. Pro hydrofilní sloučeniny se běžně používají roztoky solí nebo pufované roztoky solí (fyziologický roztok, PBS pufr) s pH kolem 7,4. Pro testování lipofilních látek se přidává sérový albumin nebo vhodné emulgační činidla v množství, které nenarušuje integritu membrány. K receptorové kapalině je také možno přidat antibakteriální látku, např. azid sodný. Před analýzou by měla být receptorová kapalina odplyněna, aby se zabránilo tvoření bublinek v průběhu experimentu [7, s. 6], [11, s. 4673–4674], [25, s. 23–24].

### 2.2.1.3 Příprava kůže

„Zlatým standardem“ pro testování transdermální absorpce látek metodou průchodu kožní membránou *in vitro* je použití lidské kůže. Nejčastěji se používá kůže ze zad, břicha, hrudníku nebo boku, a je získávána z tkáňové banky nebo od živých dárců při chirurgických operacích. Při použití takto získané kůže je nutný informovaný souhlas dárce [3, s. 534].

Anatomickou a fyziologickou strukturou a chemickým složením jsou lidské kůži velmi podobné kůže prasečí a opičí. Z důvodu lepší dostupnosti se však využívá kůže prasečí ze zad, boků nebo břicha zvířete. Velmi často se v experimentech používá kůže z ušního boltce prasete, jejíž struktura je lidské kůži nejvíce podobná [26, s. 2378], [27, s. 1852], [28, s. 22].

Alternativou k přirozené kůži jsou uměle vytvořené modely kůže. Komerčně dostupné modely Episkin®, SkinEthic® a EpiDerm® jsou vypěstovány metodou *in vitro* z keratinocytů na vhodném podkladu. Stavbou a složením lipidů jsou podobné lidské tkáni, ale jejich největší nevýhodou je mnohem výraznější propustnost, proto mohou být použity pouze k orientačnímu testování látek [29, s. 169–175].

Lidskou nebo zvířecí kůži je možno použít v plné tloušťce 500–1 000 μm, nebo kůži seříznutou dermatomem na tloušťku 200–500 μm, tato kůže obsahuje SC, zbývající vrstvy *epidermis* a pouze horní část *dermis*. Dermatomem seříznutá kůže je vhodnější pro testování lipofilních látek, protože hydrofilní *dermis* by představovala další bariéru průniku. Další možností je použití tepelně, chemicky nebo enzymaticky oddělené *epidermis*, nebo pouze

SC připravované z *epidermis* po natrávení trypsinem. Pro testování je optimální použití čerstvé kůže (do 2 dnů od odběru), pro testování průniku látek je však z dlouhodobé použitelnosti (do 1 roku skladování) oficiálně doporučována kůže zmrazená na teploty od  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Je nutno si uvědomit, že s rostoucí dobou skladování roste i propustnost zmrazené kůže [7, s. 4], [8, s. 8], [30, s. 458].

Odebraná kůže by měla být očištěna, zbavena viditelných chlupů, a podkožní tukové tkáň. Prasečí kůže by neměla být na jatkách spařena. Před vlastním experimentem je nutno vizuálně zhodnotit neporušenost kožní membrány a odstranit poškozené kusy. Neporušená kůže je rozstříhána na potřebnou velikost a upevněna mezi horní a dolní část difuzní komůrky, naplněné receptorovou kapalinou. Před aplikací testované látky by měla být kůže ponechána ve styku s receptorovou kapalinou 10–30 min, aby došlo k vyrovnání povrchu a hydratace. Také se doporučuje zhodnotit integritu kůže pomocí metody měření transepidermální ztráty vody (TEWL) nebo elektrického odporu kůže (TER). Může být také proveden pokus průchodu referenční látky absorpční membránou, jehož nevýhodou může být porušení membrány vedoucí ke zvýšené propustnosti testované látky. Jako referenční látka se používá triciovaná voda, kofein nebo sacharóza [3, s. 535], [31, s. 355].

#### 2.2.1.4 Testovaná látka

Schopnost chemických látek procházet kůží s neporušenou kožní bariérou závisí na několika vlastnostech testované látky. Hlavní vlastností je jejich hydrofilita nebo lipofilita. Přes SC dobře prochází lipofilní látky s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda  $K_{O/W} > 1$ , které se zde mohou i usazovat. Dobrá je i propustnost amfifilních látek, jež mají současně vlastnosti hydrofilní i lipofilní. Maximální je však absorpce látek s  $K_{O/W}$  1–2, a rychle se snižuje u látek s  $K_{O/W} > 3,5$ . Lipofilní látky jsou přes *epidermis*, *dermis*, i v krevním řečišti transportovány hlavně ve vazbě na lipoproteiny, na rozdíl od látek hydrofilních ( $K_{O/W} < 1$ ), které se přes SC dostávají špatně (pouze přes póry, vlasové folikuly a potní žlázy). V hlubších vrstvách kůže a v krevním řečišti je transport hydrofilních látek velmi snadný. Další důležitou vlastností testovaných látek je velikost jejich molekuly (molekulová hmotnost). Přes SC mohou dobře procházet látky s molekulovou hmotností do 500 Da, avšak při poškození kůže (např. atopická kůže) mohou pronikat i látky s molekulovou hmotností až do 800 Da [13, s. 72], [32, s. 681], [33, s. 995–997].

### 2.2.1.5 *Rozpouštědlo*

Rozpouštědlem pro testovanou látku může být jakákoliv chemická látka, nesmí však poškozovat kůži a kožní bariéru, a testovaná látka v ní musí být dobře rozpustná. V této souvislosti je nutné si uvědomit, že některé tyto látky mohou ovlivňovat transdermální penetraci. Enhancery penetraci zvyšují a urychlují, naopak retardéry ji snižují a zpomalují. Obě skupiny jsou v současné době intenzivně studovány [20, s. 6–8].

### 2.2.1.6 *Aplikace testované látky*

Znamé množství testované látky je aplikováno na přesně stanovenou plochu pokožky. Testovaná látka může být aplikována dvěma způsoby:

- konečná dávka (finite dose), kdy množství aplikované látky činí  $1\text{--}5\text{ mg cm}^{-2}$  nebo  $10\text{ }\mu\text{l cm}^{-2}$  a postačí k pokrytí kůže. Kůže je pak ponechána bez okluze a situace nejvíce připomíná reálnou expozici;
- nekonečná dávka (infinite dose), kdy je testovaná látka v trvalém nadbytku a aplikované množství činí  $> 10\text{ mg cm}^{-2}$ , nebo  $> 100\text{ }\mu\text{l cm}^{-2}$  a k eliminaci odparu se využívá okluze [3, s. 536], [11, s. 4674].

### 2.2.1.7 *Průběh testování*

Při uspořádání testu leží absorpční membrána spodní plochou na hladině receptorové kapaliny, která je po celou dobu testu míchána (statická komůrka) nebo průběžně vyměňována (průtoková komůrka). Na povrchu kůže v difuzní komůrce je během experimentu udržována již zmíněná teplota  $32 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  a vlhkost okolního prostředí by měla být v rozmezí 30–70 %. Doba expozice je různá, měla by však odrážet podmínky reálného použití látky. Může se pohybovat od několika minut pro oplachované (rinse-off) produkty až po 24 h pro produkty, které se neoplachují (leave-on). V případě průmyslových výrobků je doba expozice 6–8 h. Akceptována může být i doba 48 h, při níž však může dojít k porušení integrity membrány. Standardní doba expozice testované látky aplikované v konečné dávce je 24 h [3, s. 537], [11, s. 4674–4675].



### 2.2.1.8 Zpracování výsledků

Po aplikaci konečné dávky by měla být testovaná látka stanovena v přebytku na kůži, ve SC, viabilní části *epidermis*, *dermis* a v receptorové kapalině. Množství látky, které zůstává ve SC, není považováno za dermálně absorbované. Ve zbylých vrstvách *epidermis* a *dermis* se množství látky považuje za absorbovanou, a v receptorové kapalině za systémově dostupnou. Množství látky absorbované v jednotlivých vrstvách SC se zjišťuje tzv. stripováním, kdy se jednotlivé vrstvy korneocytů strhávají pomocí nalepené adhezivní pásky (obvykle se provádí 15–25 stripů) a následně se analyzují. Analyzována bývá i *epidermis* a *dermis*, jež se vzájemně oddělují tepelně, chemicky nebo enzymaticky. K analýze testovaných látek lze využít řadu metod; u radioaktivně označených zkoušených látek se využívá scintilační počítání, u ostatní látek jsou pak vhodné chromatografické metody, např. HPLC, LC-MS a GC. Celková návratnost testované látky, získaná z povrchu kůže, jednotlivých částí kůže a receptorové kapaliny, by měla být  $100 \pm 10 \%$  (dle WHO) nebo 85–115 % (dle SCCP). Hodnota dermální absorpce by měla být vyjádřena jako absolutní množství ( $\text{mg cm}^{-2}$  povrchu kůže) nebo jako procento z množství testované látky obsažené v dávce aplikované na  $\text{cm}^2$  povrchu kůže [7, s. 9–10], [8, s. 51].

V případě aplikace nekonečné dávky se stanovuje koeficient propustnosti  $K_p$  ( $\text{cm h}^{-1}$  nebo  $\text{cm s}^{-1}$ ), který je dán podílem ustáleného průtoku ( $\mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ) a koncentrace testované látky, aplikované na kůži ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) [8, s. 51].

### 2.2.2 Testování *in vivo*

Hlavní výhodou *in vivo* metody je používání fyziologicky a metabolicky intaktního systému. Studie jsou prováděny na laboratorních zvířatech (hlodavcích) nebo na lidských dobrovolnících. Dobrovolníci bývají využíváni hlavně při testování humánních farmaceutik. Nejčastěji používanými hlodavci při testování toxicity látek jsou potkani. Metodika testování podle OECD však uvádí i možnost použití jiných druhů zvířat, u kterých byla prokázána podobná absorpce kůží jako u lidí, např. opic a prasat. Další možností je použití holých krys nebo myší. Hlavními nevýhodami použití laboratorních zvířat jsou potíže při stanovení časné fáze absorpce a rozdíl ve stavbě a propustnosti zvířecí a lidské kůže. Zvířecí kůže má vyšší permeabilitu než lidská, a navíc je u zvířat nutné chránit místo aplikace přípravku před pozřením [8, s. 60], [34, s. 432–437].

Testovaná látka je aplikována po určitou dobu na vyznačenou oholenou plochu kůže. Dávka aplikované látky a doba expozice by měly odpovídat předpokládané expozici u člověka. Zkoumaným zvířatům se v pravidelných časových intervalech odebírají výkaly a tělní tekutiny (moč a krev), které se analyzují vhodnými analytickými metodami na přítomnost testované látky, případně jejích metabolitů. U člověka se obvykle posuzuje plazma a výkaly, může se však také provádět analýza dechu, stripování *SC*, mikrodialýza nebo rentgen [35, s. 1–8].

Závěrem je nutno podotknout, že podle Nařízení (ES) 1223/2009, není v Evropské unii povoleno testování transdermální absorpce nových kosmetických přísad na zvířatech [36, s. 534].

### 3 CYTOTOXICITA

Cytotoxicita je definována jako schopnost chemické látky způsobit nepříznivé účinky zasažené buňce. K těmto negativním procesům lze řadit narušení buněčných struktur nebo procesů nutných pro přežití, dělení a funkčnost této buňky. Cytotoxicita je parametr, který musí být testován u léčiv, zdravotnických prostředků a kosmetických přípravků. Vzhledem k tomu, že všechny jmenované výrobky přichází do styku s buňkami, musí být prokázáno, že nejsou cytotoxické [37, s. 121], [38, s. 365].

Konkrétní test cytotoxicity je volen podle druhu studie, předpokládaného účinku a místa aplikace. *In vitro* studie cytotoxicity lze klasifikovat do pěti tříd:

- životaschopnost (viabilita) – okamžitá odezva, jako např. zvýšená nebo nekontrolovatelná změna v propustnosti membrány;
- přežití – schopnost dlouhodobého uchování sebeobnovy buněk (5–10 generací);
- metabolismus – mikrotitrační testy měřící metabolickou odezvu (dehydrogenázová aktivita, syntéza DNA, RNA nebo proteinů) v době expozice testované látky nebo krátce po ní;
- genotoxicita a transformace – přežití buněk ve změněném stavu nebo nádorové transformaci;
- dráždivost – uvolnění cytokinů v orgánových kulturách, které vyvolá reakce analogické zánětu nebo alergii [38, s. 366].

#### 3.1 Testování životaschopnosti buněk

Vystavení buněk cytotoxickým látkám může narušit jejich buněčnou membránu, což vede k úniku buněčného obsahu. Testování životaschopnosti buněk patří k rychlým a často používaným testům, a provádí se např. s použitím neutrální červeně nebo trypanové modři. K rozlišení mezi živými a mrtvými buňkami se používají i kolorimetrické testy, jež detekují narušené buněčné membrány [39, s. 28–29].

##### 3.1.1 Test s neutrální červení

Neutrální nebo toluenová červeně jsou slabá kationická barviva, která mohou procházet plazmatickou membránou difúzí a následně se hromadit v lysozomech buňky. Při narušení buněčné membrány se využití neutrální červeně sníží a může unikat z buňky. To umožní

rozlišení živých a mrtvých buněk. Kvantitativní vyhodnocení cytotoxicity se provádí spektrofotometricky měřením absorbance neutrální červeně při různé expozici testované látky.

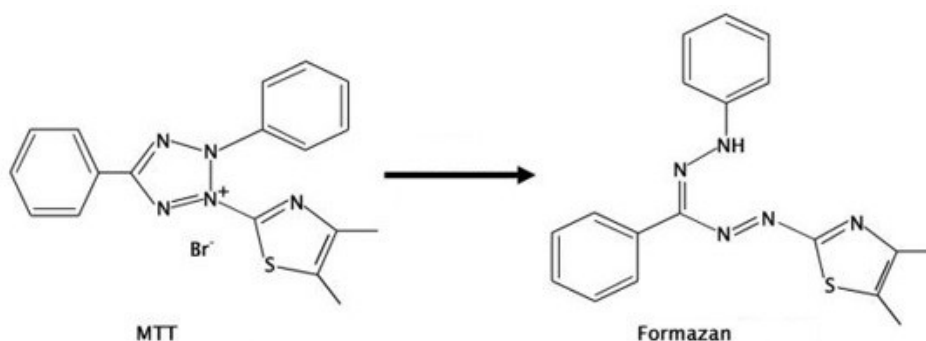
### 3.1.2 Test s trypanovou modří

Trypanová modř patří mezi diazobarviva, jež jsou propustná pouze buňkami s oslabenou membránou. Mrtvé buňky jsou tedy zbarveny modře, zatímco živé buňky zůstávají bezbarvé. Množství odumřelých buněk se stanoví např. pomocí optické mikroskopie [39, s. 28].

### 3.1.3 Kolorimetrické testy

Mitochondriální aktivita může být testována s použitím tetrazoliové soli. Aktivní mitochondrie obsahují enzymy-dehydrogenázy štěpící tetrazoliový kruh, k reakci však dochází pouze v živých buňkách.

Nejrozšířenějším testem je MTT test, kdy uvnitř živých buněk dochází ke změně světle žlutého 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu na tmavě modrý, ve vodě nerozpustný formazan. Princip testu je založen na vystavení buněk, v exponenciální fázi růstu, cytotoxické látky. Délka expozice je stanovena jako čas potřebný pro maximální poškození buněk, ale je ovlivněna i stabilitou látky. Po odstranění cytotoxické látky se buňky nechají množit ke zdvojnásobení populace, čímž se odliší životaschopné buňky schopné množení od životaschopných buněk, které se již nemohou množit. Počet živých buněk je následně stanoven nepřímo redukcí MTT barviva na formazan (Obr. 6), jehož množství se stanoví spektrofotometricky, kdy se měří jeho absorbance při vlnové délce 570 nm [38, s. 373], [39, s. 29], [40, s. 316].



Obr. 6: Redukce MTT na formazan [41].

## 4 EMULZE

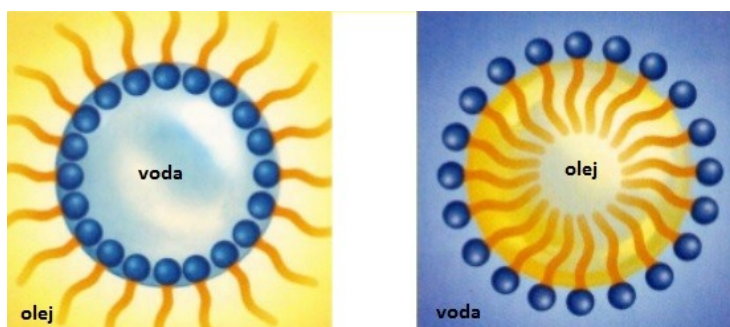
Emulze jsou heterogenní disperzní soustavy složené ze dvou vzájemně nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalin. Jedna z kapalin tvoří disperzní podíl rozptýlený ve formě kapiček v kapalině druhé, která je disperzním prostředím. Pro tvorbu emulze je rovněž nutná přítomnost povrchově aktivních látek (surfaktantů), které brání shlukování dispergovaných kapek. Nejčastěji se setkáváme s emulzemi typu olej ve vodě (O/V – emulze přímé) a emulzemi typu voda v oleji (V/O – emulze obrácené) [42, s. 26], [43], [44, s. 188], [45, s. 80].

### 4.1 Klasifikace emulzí

Emulze lze klasifikovat na základě řady kritérií, kterými jsou např. polarita disperzního prostředí, koncentrace disperzního podílu či velikost rozptýlených částic. Jednotlivé skupiny jsou podrobněji rozvedeny níže.

#### 4.1.1 Podle polaritý disperzního podílu a prostředí (Obr. 7):

- emulze přímé – označované jako emulze O/V, nebo 1. druhu, ve kterých je disperzním prostředím polárnější kapalina;
- emulze obrácené – označované jako emulze V/O, nebo 2. druhu, jejichž disperzním prostředím je nepolární kapalina [44, s. 188].



Obr. 7: Emulze obrácená (vlevo) a přímá (vpravo) [46].

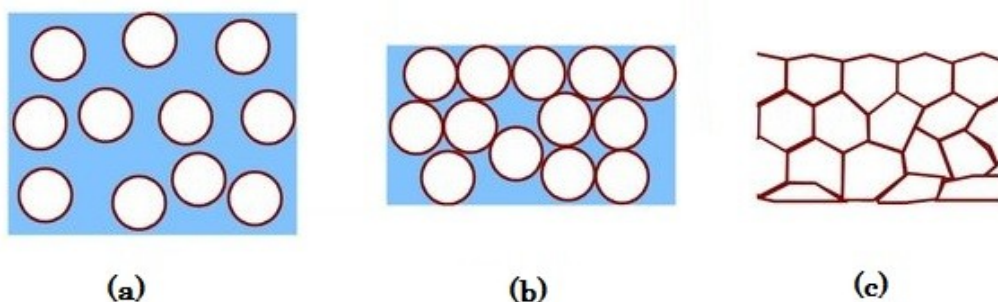
Typ emulze lze určit:

- podle jejich elektrické vodivosti – je dána vodivostí disperzního prostředí, kdy emulze O/V jsou mnohem vodivější než emulze V/O);
- podle schopnosti rozpouštět polární nebo nepolární barviva;
- podle schopnosti mísit se s rozpouštědly různé polarity – emulze lze ředit kapalinou mísící se s jejím disperzním prostředím;

- pozorováním v UV světle – fluorescence olejové fáze;
- podle smáčivosti – emulze O/V smáčí hydrofilní povrchy a naopak emulze V/O povrchy hydrofobní [43].

#### 4.1.2 Podle koncentrace disperzního podílu (Obr. 8):

- emulze zředěné – dispergovaná fáze zde zaujímá max. 2 % objemu emulze a průměr kapek obvykle činí 100 nm a je tedy blízký rozměru koloidních částic;
- emulze koncentrované – obsahují nedeformované kapky, v nichž je koncentrace disperzního podílu až 74 obj. % (monodisperzní systémy), což odpovídá nejtěsnějšímu geometrickému uspořádání kulovitých částic;
- emulze vysoce koncentrované (gelovité) – částice disperzního podílu jsou v nich uspořádány tak těsně, že se vzájemně deformují do tvaru mnohostěnnů, oddělených tenkými filmy tvořenými vrstvami disperzního prostředí a emulgátoru [42, s. 27].



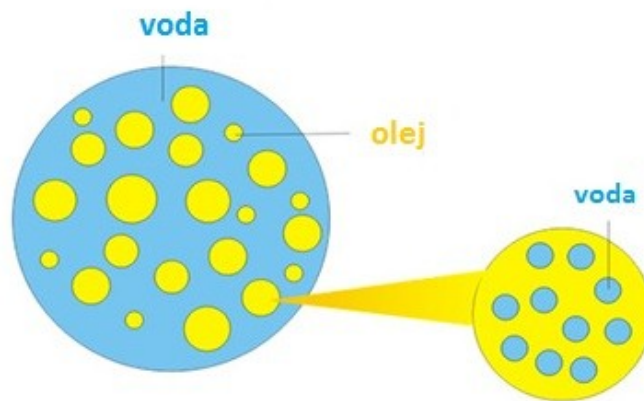
Obr. 8: Emulze zředěná (a), koncentrovaná (b), gelovitá (c), upraveno dle [47].

#### 4.1.3 Podle velikosti rozptýlených částic:

- makroemulze – velikost částic se pohybuje v rozmezí 100–1 000 nm, jsou kalné, mléčně zbarvené a termodynamicky nestabilní;
- nanoemulze – velikost částic je v rozmezí 50–200 nm, jsou transparentní až semitransparentní, termodynamicky nestabilní a kineticky stabilní;
- mikroemulze (micelární emulze) – obsahují částice o velikosti 10–100 nm, jsou čiré a termodynamicky stabilní. Vznikají spontánně při vysokých koncentracích povrchově aktivní látky za současné přítomnosti ko-surfaktantu (např. alkoholy se střední délkou řetězce) [43], [48, s. 522], [49, s. 2].

Zvláštním typem emulzí jsou složené emulze (Obr. 9) a kritické emulze:

- Složené emulze jsou takové emulze, jejichž disperzní podíl je také tvořen emulzí. Např. emulze typu V/O/V je tvořena částicemi vody, které jsou dispergovány v částicích oleje, a ty jsou ještě následně dispergovány v kontinuální vodné fázi. Tyto emulze se obvykle připravují dispergací ve dvou krocích za použití dvou typů surfaktantů (hydrofilního a hydrofobního). Jejich stabilita je ale, kvůli velké ploše fázového rozhraní, nižší než v případě jednoduchých emulzí [43];



Obr. 9: Složená emulze typu V/O/V [50].

- Kritické emulze jsou tvořeny dvěma omezeně mísitelnými kapalinami a vznikají při teplotě blízké kritické rozpouštěcí teplotě. K dispergování stačí jen tepelný pohyb molekul. Tyto emulze však existují pouze v úzkém teplotním intervalu a vyznačují se nestálostí disperzního podílu [48, s. 522].

## 4.2 Stabilita emulzí

Stabilita emulzí je definována jako schopnost setrvat ve stavu, ve kterém se významně nemění jejich původní vlastnosti. Posuzuje se z kinetického a termodynamického hlediska, kdy termodynamická stabilita udává pravděpodobnost rozpadu dané emulze, zatímco stabilita kinetická vyjadřuje rychlost jejího rozpadu. Emulze jsou systémy agregátně nestálé, je tedy nutné je vhodným způsobem stabilizovat [44, s. 189], [51, s. 169–173].

### 4.2.1 Stabilizace elektrickou dvojrstvou

Tento typ stabilizace se uplatňuje pouze v případě zředěných emulzí, jelikož vzájemné srážky emulzních kapek zde nejsou příliš časté. Vznik elektrické dvojrstvy je spojen s rozdílnou rozpustností přítomných kationtů a aniontů ve vodné a olejové fázi, kdy kationty jsou více rozpustné ve vodné fázi a anionty ve fázi olejové. Čím větší je náboj kapky a tloušťka dvojrstvy, tím účinněji brání odpudivé síly mezi kapičkami vzniku koalescence. [43], [44, s. 189–190].

### 4.2.2 Stabilizace pomocí surfaktantu

V koncentrovanějších emulzích již stabilizace elektrickým nábojem není dostatečná, a proto je třeba stabilitu zajistit přidáním vhodné třetí složky – surfaktantu. Surfaktant vytváří na povrchu kapek ochranný film, který zabraňuje jejich koalescenci při tepelné nebo sedimentační srážce. Hromadí se na rozhraní obou fází a vytváří tam soudržný, elastický film, který nejeví adhezi k filmům vytvořeným okolo jiných kapek [42, s. 74], [43].

Mezi vhodné surfaktanty patří řada látek, např. látky schopné gelace či asociace v micely. Ve vznikajících filmech jsou vázány dostatečně velkými mezimolekulárními silami, které jim dodávají pevnost a soudržnost.

Zvláštní skupinou látek schopných stabilizovat emulzní systémy jsou i jemné nerozpustné prášky, které jsou částečně smáčené oběma fázemi. Částice prášků mají schopnost vytvořit kolem kapek emulze dostatečně pevný obal, který zabraňuje koalescenci. Obecně pro ně platí, že uvnitř kapky je ta fáze, která méně smáčí práškový emulgátor. Hydrofobní prášky tedy stabilizují emulze typu V/O a naopak. Mezi významné typy emulzí stabilizovaných pevnými částicemi se řadí Pickeringovy emulze, podrobněji popsané v následující kapitole [42, s. 74], [43], [44, s. 190].



Látky používané ke stabilizaci emulzí lze zařadit do následujících skupin:

- asociativní koloidy – hydrofilní (soli vyšších MK), rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (soli vícemocných kovů a stříbra), sulfonové kyseliny a soli sulfonovaných alkoholů;
- makromolekulární koloidy – hydrofilní (proteiny a polysacharidy) i rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (kaučuk);
- práškovité emulgátory – hydrofilní i hydrofobní povahy [44, s. 190].

#### 4.2.3 Stérická stabilizace

Stérická stabilizace je stabilizace emulzních kapek pomocí polymerů, jejichž makromolekuly jsou schopny dostatečně silné adsorpce na povrchu kapek a současně jsou rozpustné v disperzním prostředí. Díky tomu, že makromolekuly obklopují celý povrch kapek, nedochází k jejich dalšímu přibližování ani rozpadu [52, s. 385], [53, s. 2].

#### 4.2.4 Stabilizace pomocí deplece

K depleční stabilizaci dochází při vyšších koncentracích polymeru v disperzním prostředí, zároveň však i emulzní kapky musí být od sebe dostatečně vzdáleny. Pokud se kapky přiblíží na malou vzdálenost, makromolekuly polymeru jsou z prostoru mezi částicemi vypuzovány, mezi kapkami se tak mohou uplatnit přitažlivé Van der Waalsovy síly a nastává flokulace, tedy agregace částic do větších celků [54, s. 7].

#### 4.2.5 Stabilizace hydratací

Stabilizace hydratací je umožněna působením odpudivých sil, způsobených změnou v uspořádání hydratovaného povrchu. K tomu dochází, pokud povrch obsahuje molekuly vody spojené vodíkovými vazbami [55, s. 238].

## 5 PICKERINGOVY EMULZE

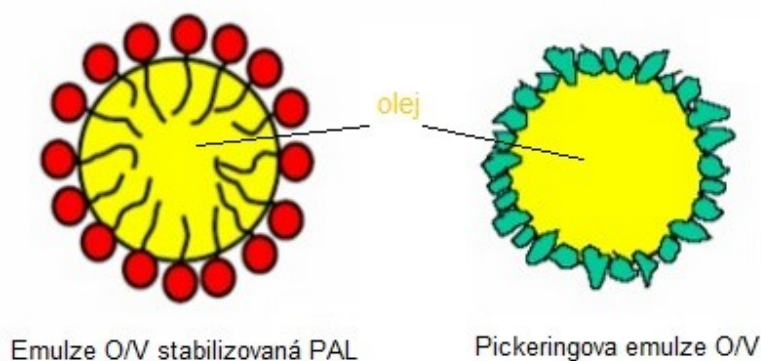
Pickeringovy emulze byly objeveny S. U. Pickeringem již v roce 1907, ale dlouhou dobu byly ignorovány. Jedná se o emulzní systémy, jejichž atraktivita spočívá v tom, že umožňují nahrazení klasických povrchově aktivních látek šetrnějšími pevnými částicemi [56, s. 123], [57, s. 23–24].

### 5.1 Obecná charakteristika

Pickeringovy emulze si zachovávají základní vlastnosti emulzí stabilizovaných povrchově aktivními látkami (PAL), a proto je mohou nahradit ve většině kosmetických i farmaceutických aplikací. Klasické PAL přítomné v kosmetických přípravcích mohou způsobovat např. podráždění kůže nebo hemolytické chování, při aplikaci v léčivých přípravcích pak mohou působit toxicky nebo měnit distribuci a vylučování současně podaných léčiv. Další výhodou Pickeringových emulzí je jejich schopnost zvýšit propustnost látek přes *SC* v některých lékových formulacích, a způsobit akumulaci léčiv ve *SC* [58, s. 183], [59, s. 274].

### 5.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Díky stabilizaci pevnými částicemi jsou Pickeringovy emulze velmi odolné vůči koagulaci, koalescenci a Ostwaldovu zrání. Stabilizace kapek emulze se uskutečňuje prostřednictvím adsorpce pevných částic na povrchu kapek emulze, což je obdobné jako v případě stabilizace emulzí pomocí PAL. Mechanismus adsorpce je však odlišný díky tomu, že pevné částice nemusí být amfifilní. Důvodem silného kotvení pevných částic na rozhraní olej-voda je částečné smáčení povrchu pevných částic vodou i olejem. Pevné částice stabilizující tyto emulze jsou mnohem menší (řádově od nm do několika  $\mu\text{m}$ ) než velikost kapek emulze. Velikost emulzních kapek je dána koncentrací pevných částic, stejně jako v případě klasických emulzí, u nichž závisí na koncentraci PAL. Větší množství stabilizujících částic tedy umožní tvorbu větší mezipovrchové plochy, což vede ke vzniku menších kapek emulze. Rozdíl mezi klasickou a Pickeringovou emulzí je na Obr. 10 [57, s. 23–24], [59, s. 268–270], [60, s. 160].



Obr. 10: Rozdíl mezi klasickou a Pickeringovou emulzí [61].

Pro částice stabilizující Pickeringovy emulze je typická dvojitá smáčivost, díky níž se hromadí na fázovém rozhraní. Částice tak mohou stabilizovat jak emulze typu O/V, tak i emulze typu V/O. Typ emulze, kterou budou částice stabilizovat, lze odvodit z kontaktního úhlu na rozhraní olej-voda. Kapalná fáze, která smáčí částice více, bude tvořit spojitě prostředí. Částice s kontaktním úhlem  $< 90^\circ$  vytvoří emulze typu O/V a částice s kontaktním úhlem  $> 90^\circ$  obvykle tvoří emulze typu V/O [60, s. 159].

### 5.3 Biopolymery stabilizující Pickeringovy emulze

Pro použití v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu jsou atraktivní ekologicky šetrné formulace Pickeringových emulzí, které jsou stabilizovány biologicky rozložitelnými nanočásticemi. Tyto částice jsou většinou organického původu, např. lipidové krystaly, celulóza, chitin, proteinové micely, škrobové granule, ale i částice potažené hydroxyapatitem [57, s. 30], [62, s. 151].

#### 5.3.1 Lipidové krystaly

Stabilizace pomocí lipidových krystalů je typická pro emulze typu V/O. Tyto krystaly poskytují stabilizaci emulzních systémů pomocí tvorby sítě v objemové fázi, Pickeringovou stabilizací, nebo kombinují oba tyto mechanismy. Stabilizace pomocí sítě zahrnuje imobilizaci dispergované fáze v kontinuální krystalické matici, zatímco Pickeringova stabilizace je dána adsorpcí krystalů na rozhraní olej-voda. Obecně platí, že triacylglyceroly poskytují stabilizaci pomocí tvorby krystalické sítě, a nasycené monoacylglyceroly tvoří krystalické monovrstvy na rozhraní. Ke stabilizaci Pickeringových emulzí v potravinářství se používají krystaly monoacylglycerolů, jež jsou méně hydrofobní než di- a triacylglyceroly [60, s. 163].

### 5.3.2 Polysacharidy

#### 5.3.2.1 Škrobové granule a granule modifikovaného škrobu

Škrob je biopolymer běžně se vyskytující v hlízách brambor a v obilovinách. Nachází se zde ve formě semikrystalických granulí a skládá se ze dvou polymerů, amylozy a amylopektinu. Škrobové granule mají velikost mezi 0,5–100  $\mu\text{m}$  a liší se tvarem i charakterem povrchu. Nemodifikované škrobové granule se díky hydrofilitě používají ke stabilizaci emulzí typu O/V. Zvýšení afinity škrobů k oleji lze dosáhnout jejich modifikací pomocí hydrofobní oktenylové skupiny, karboxylové skupiny nebo její sodné soli. Takto modifikované škroby slouží ke stabilizaci Pickeringových emulzí typu V/O. V potravinářství je povoleno použití škrobu se stupněm modifikace do 3 % [60, s. 165].

#### 5.3.2.2 Chitin a chitosan

Přírodní chitin se nachází v tvrdé skořápce korýšů a díky přítomnosti krystalické a amorfni domény má semikrystalickou strukturu. Amorfni doménu lze pomocí kyselé hydrolyzy rozštěpit, vzniká tak chitin s vyšší krystalinitou, známý také jako chitinové nanokrystaly. Zvýšení koncentrace chitinových nanokrystalů má vliv na reologické vlastnosti a stabilitu emulzí. Například O/V emulze stabilizované těmito nanokrystaly byly stabilní proti shlukování po dobu jednoho měsíce.

Chitosan se získává alkalickou deacetylací chitinu, několikahodinovým varem s 50% hydroxidem sodným nebo enzymaticky působením N-deacetylasy. Rozpustnost chitosanu ve vodě je závislá na pH. Při nízké hodnotě pH je chitosan kladně nabitý, při vyšším pH dochází k jeho deprotonaci a nenabitě polymerní řetězce se sdružují a vytvářejí částice. Nemodifikované chitosanové částice se mohou adsorbovat na rozhraní olej-voda a stabilizovat tak emulze typu O/V. Nicméně díky rozpustnosti chitosanu ve vodě, závislé na pH, je vznik těchto emulzí reverzibilní [60, s. 165].

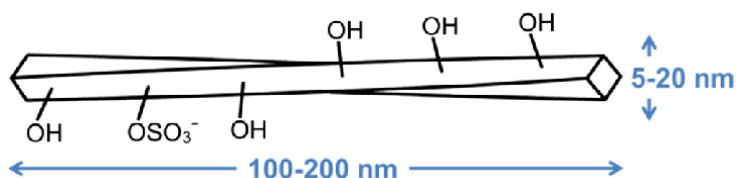
#### 5.3.2.3 Celulóza

Celulóza je polysacharid tvořený molekulami  $\beta$ -D-glukózy spojenými  $\beta$ -1,4 glykosidickou vazbou. Je to důležitý strukturní prvek buněčných stěn zelených rostlin a vyskytuje se rovněž v biofilmu produkovaném některými bakteriemi. Celulóza je materiál, který je dostupný, biologicky rozložitelný a netoxický. Nativní celulóza se vyskytuje ve formě semikrystalických makroskopických vláken nebo jako mikrofibrilární celulóza (MFC). Amorfni oblast vláken může být odstraněna hydrolyzou, např. v kyselém prostředí, čímž vzniká

mikrokrystalická celulóza (MCC). Při dlouho trvající hydrolyze z MCC vzniká nanokrystalická celulóza (NCC). Nemodifikované typy celulózy mají díky krystalické organizaci více hydrofilní povahu, a díky tomu tvoří velmi stabilní Pickeringovy emulze typu O/V.

Snadno dostupná MFC je díky netoxické povaze mikrovláken využívaným stabilizátorem emulzí. Povrch mikrovláken je bohatý na hydroxylové skupiny, které jsou vhodným místem pro zavedení nových funkčních skupin (pro modifikaci), pomocí které lze snadno ovlivnit hydrofobicitu MFC. Hydrofobně modifikovaná MFC je pak vhodná ke stabilizaci emulzí typu V/O. Další z celulózových částic MCC, díky hydrofilní povaze svého povrchu, stabilizuje emulze typu O/V, v nichž tvoří síť kolem olejových kapiček. Je také vhodným stabilizátorem násobných emulzí typu V/O/V v systémech s řízeným uvolňováním léčiv [63, s. 448], [64, s. 202–203].

Nanokrystalická celulóza (NCC) neboli celulózové nanokrystaly jsou zejména hydrofilní (díky vysoké hustotě hydroxylových skupin a kontaktnímu úhlu kolem  $20^\circ$ ) a díky tomu tvoří velmi stabilní Pickeringovy emulze typu O/V. Nicméně organizace krystalických částí řetězců tohoto polymeru umožňuje vytvoření „hydrofobních konců“ nanokrystalů, což jim celkově propůjčuje amfifilní vlastnosti. Krystaly NCC (Obr. 11) mají v průřezu 5–20 nm a délku stovky nm. Jejich použití pro stabilizaci emulzí je výhodné kvůli třem hlavním charakteristikám, jimiž jsou 1) ireverzibilní adsorpce na rozhraní, která vede k vytvoření vysoce stabilní struktury; 2) tvar tyčinky umožňující vytvoření sítě, která zvýší soudržnost a stabilitu; 3) příznivé biologické vlastnosti, jelikož se jedná o netoxický běžně dostupný materiál z obnovitelných zdrojů. Samotné celulózové nanokrystaly nemají výraznou povrchovou aktivitu, nicméně jejich vhodné směsi s fosfolipidy, mastnými kyselinami a jinými biologickými PAL by mohly vést k přípravě Pickeringových emulzí s výjimečnou stabilitou [65, s. 291], [66, s. 140–147].



Obr. 11: Struktura CNC [67].

Celulózu jsou schopné syntetizovat i některé bakterie (např. *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973). Bakteriální celulóza (BC) se skládá z náhodně sestavených vláken o velikosti ca 100 nm. I když je chemická struktura BC podobná rostlinné celulóze, má BC

řadu výhod, např. nižší hustotu, vyšší krystalinitu, vyšší mechanickou pevnost a vyšší čistotu. BC je proto vhodným stabilizátorem Pickeringových emulzí typu O/V. Obdobně jako jiné typy celulózových krystalů, vykazuje BC vysokou odolnost vůči koalescenci a není ovlivněna změnami pH, teploty a iontové síly prostředí [68, s. 225–232].

### 5.3.3 Proteiny

Bílkoviny jsou amfifilní biopolymery schopné stabilizovat emulze typu O/V. Emulze jsou stabilizovány prostřednictvím tvorby fyzikální bariéry mezi emulzními kapkami, čímž dochází k tvorbě odpudivých interakcí (stérické nebo elektrostatické). Mimo tuto stabilizaci mohou být emulze stabilizovány i tvorbou proteinových agregátů. Ke stabilizaci emulzí se využívají částice na bázi proteinů rostlinného i živočišného původu. Z rostlinných zdrojů jsou využívány např. sójové a kukuřičné proteiny, ze živočišných zdrojů jsou to syrovátkové proteiny, hovězí laktoglobulin, laktoferin, sérový albumin,  $\alpha$ -laktalbumin nebo želatina [60, s. 166].

### 5.3.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin, strukturně se jedná o polyfenoly s 15-C skeletem. Ve vodné fázi se vyskytují jako nerozpustné částice schopné adsorpce na rozhraní olej-voda. Používají se ke stabilizaci Pickeringových emulzí typu O/V. Např. flavonoidy tilirosid, rutin a marigin působí při pH > 8 zvýšení stabilizace emulzí [60, s. 167].

### 5.3.5 Vosky

Vosky mohou být přírodní (např. včelí vosk) nebo syntetické (např. na bázi polyethylenu). V jejich struktuře se může nacházet široká škála alkanů s dlouhým řetězcem, estery, polyesteru a hydroxylované estery alkoholů s dlouhým řetězcem mastných kyselin. Vosky jsou velmi hydrofobní a používají se tedy ke stabilizaci Pickeringových emulzí typu V/O. Mechanismus stabilizace zahrnuje adsorpci voskových částic na rozhraní voda-olej a vytvoření sítě částic v kontinuální olejové fázi, která způsobí imobilizaci dispergovaných kapek vody, a tím zabrání jejich sedimentaci [60, s. 167].

## 6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Metoda transdermální absorpce aktivních látek patří k důležitým postupům pro hodnocení jejich bezpečnosti. Touto metodikou se zabývá řada prací. Lenka Kotingová a kolektiv [3] ve svém článku *Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro* obecně popisují laboratorní postupy testování dermální absorpce chemických látek, a podrobněji se zabývají popisem kožní membrány a difuzními komůrkami, které jsou k testování používány. „Zlatým standardem“ pro testování transdermální absorpce látek metodou průchodu kožní membránou *in vitro* je použití lidské kůže. Alternativou k lidské kůži jsou kůže prasečí (z ušního boltce), kůže opičí, nebo uměle vytvořené modely kůže. Lidskou nebo zvířecí kůži je možno použít v plné tloušťce 500–1 000  $\mu\text{m}$ , nebo kůži seříznutou dermatomem na tloušťku 200–500  $\mu\text{m}$ , tato kůže obsahuje *SC*, zbývající vrstvy *epidermis* a pouze horní část *dermis*. Dermatomem seříznutá kůže je vhodnější pro testování lipofilních látek. Pro testování je optimální použití čerstvé kůže, vzhledem k dlouhodobé použitelnosti je však oficiálně doporučována kůže zmrazená na teploty od  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Neporušená kůže je upevněna mezi horní a dolní část difuzní komůrky, před aplikací testované látky by měla být kůže ponechána ve styku s receptorovou kapalinou o teplotě  $32 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10–30 min, a také se doporučuje zhodnotit integritu kůže pomocí metody měření transepidermální ztráty vody (TEWL), elektrického odporu kůže (TER), nebo může být proveden pokus průchodu referenční látky absorpční membránou [3, s. 534–535]. Difuzní komůrky jsou vyrobeny z inertních materiálů (sklo, teflon) a skládají se ze dvou částí. Horní část je označována jako donorová a spodní část jako receptorová, jež je naplněna receptorovou kapalinou. Mezi obě části se pak vkládá kůže pokožkou nahoru a na ni se aplikuje známé množství testované látky. Existují dva základní typy difuzních komůrek. U statické vertikální difuzní komůrky (Franzovy) musí být receptorová kapalina neustále míchána a manuálně odebírána pro analýzu, u průtokové vertikální difuzní komůrky je receptorová kapalina kontinuálně odstraňována pomocí peristaltické pumpy. Doporučená doba testování je 24 h [3, s. 536–537].

Obecné doporučení pro testování transdermální absorpce publikovala i dvojice autorů Lucie Bartošová s Jiřím Bajgarem [11]. Jednotlivá doporučení se zabývají použitou kožní membránou, difuzními komůrkami, typem receptorové kapaliny a aplikované látky, a celkovým průběhem testování. Vydaný článek tak spojuje dříve vydaná pravidla a doporučení jiných autorů (OECD, WHO, Lenka Kotingová a kolektiv).

Co se týká konkrétního testování transdermální absorpce aktivních látek enkapsulovaných do Pickeringových emulzí, není počet publikací na toto téma příliš velký. Například Frelchowska a kolektiv [68] testovali transdermální absorpci lipofilních léčiv *in vitro* ve třech různých formulacích s použitím Franzových difuzních komůrek. Prvním testovaným systémem byly klasické emulze typu O/V stabilizované surfaktantem, druhým typem byly Pickeringovy emulze typu O/V stabilizované částicemi oxidu křemičitého, a třetím systémem byl roztok retinolu v oleji. Ve všech formulacích byl obsah retinolu 0,1 %. Pro testování byla použita prasečí kůže tloušťky  $1,35 \pm 0,05$  mm, a po 24h expozici byla hodnocena distribuce retinolu ve *SC* (21 stripů), *epidermis*, *dermis* a receptorové kapalině pomocí HPLC. K extrakci retinolu byl u všech vzorků použit methanol s 0,5 % hm.  $\alpha$ -tokoferol acetátu, všechny vzorky byly pro dosažení úplné extrakce ponořeny na 20 min do ledové lázně pod ultrazvukem [68, s. 57–58]. V receptorové kapalině nebyl detekován žádný retinol a obecně byla jeho penetrace kůží špatná. Velmi často bývá penetrace lipofilních látek kůží nižší než u látek hydrofilních, vzhledem k jejich vyšší afinitě ke *SC*. Penetrace retinolu byla u obou typů emulzí pětikrát vyšší než u roztoku, ale byly i rozdíly mezi emulzemi. Z klasických emulzí retinol snadno proniknul až do *epidermis* a *dermis*, zatímco v případě Pickeringových emulzí se hromadil ve *SC*. Vzhledem k tomuto chování by mohly být Pickeringovy emulze vhodnými formulacemi pro léčiva s cílovým účinkem ve *SC*, nebo pro léčiva s pomalým uvolňováním do nižších vrstev kůže [68, s. 59–60].

Penetrací *all-trans*-retinolu z emulzí do hlubších vrstev prasečí kůže se ve své práci zabývali Simovic a kolektiv [56]. Zkoumány byly emulze stabilizované lecitinem (0,1 % hm.) a emulze stabilizované oleylaminem (1 % hm.). Současně byl zkoumán i vliv přítomnosti nanočástic oxidu křemičitého (0,5 % hm.) v těchto emulzích. Doba expozice byla u všech emulzí 24 h [56, s. 125]. Při testování emulze stabilizované lecitinem se *all-trans*-retinol nacházel pouze ve *SC* a *epidermis*. Pokud byly přidány nanočástice oxidu křemičitého, *all-trans*-retinol se nacházel v *epidermis* až ve čtyřnásobném množství a pronikl i do *dermis*. Emulze stabilizované oleylaminem umožnila rozsáhlejší průnik *all-trans*-retinolu do kůže ve srovnání s emulzemi stabilizovanými pouze lecitinem. Přidání nanočástic oxidu křemičitého nemělo významný vliv na míru penetrace *all-trans*-retinolu do kůže, pouze na jeho distribuci do hlubších vrstev kůže. Z práce jednoznačně vyplynulo, že nanočástice oxidu křemičitého výrazně zvyšují pronikání látek do hlubších vrstev kůže [56, s. 129–130].



Marku a kolektiv [70] připravili Pickeringovy emulze s vysokým obsahem olejové fáze, které stabilizovali škrobem. U těchto emulzí následně hodnotili stabilitu a vliv použitého oleje na transdermální absorpci. Pro formulaci emulzí byly použity parafínový olej, Miglyol 812 a olej získaný z plodů stromu Karité. Obsah oleje byl ve všech emulzích 56 % a ke stabilizaci emulzí byl použit škrob získaný z Merlíku čilského, jehož granule mají velikost 1–2  $\mu\text{m}$  [70, s. 1–2]. Studie ukázala, že je z výše uvedených výchozích látek možné připravit Pickeringovy emulze typu O/V, které jsou stabilní po dobu osmi týdnů. Transdermální penetrace emulzí byla poměrně vysoká, ale mezi jednotlivými typy olejů nebyl pozorován rozdíl v penetraci. Tyto formulace by tedy mohly být vhodné pro lokální podání léčiv [70, s. 6–7].

Studiem esenciálních olejů jako enhancerů/urychlovačů transdermální absorpce léčiv se zabývala dvojice Anna Herman a Andrzej P. Herman [71]. Ve své práci uvádějí, že ideální urychlovač by měl být farmakologicky inertní, nedráždivý, netoxický, kompatibilní s léky, bez chuti a bez zápachu. V současné době jsou nejvíce studovanými enhancery sulfoxidy, pyrrolidony, močovina, mastné kyseliny a jejich deriváty, alkoholy, polyoly, povrchově aktivní látky, chelatační činidla a esenciální oleje a jejich konstituenty. Tyto přírodní látky mohou transportovat léčiva přes kůži čtyřmi způsoby, jimiž jsou 1) narušení vysoce uspořádané mezibuněčné lipidové struktury mezi korneocyty ve SC, což dělá tuto vrstvu propustnější pro léky; 2) vzájemná interakce s mezibuněčnou doménou proteinů, jež způsobuje jejich konformační změny a vyšší propustnost SC; 3) částečné oddělení rozpouštědla, jež má za následek změnu vlastností SC včetně oddělování léčiva; 4) působení na desmosomální spojení mezi korneocyty nebo změna metabolické aktivity v kůži. Mechanismus účinku látek získaných z esenciálních olejů je založen zejména na změně lipidové struktury SC a interakci s proteiny, což vede ke zvýšení propustnosti pro léčiva [71, s. 474–475]. Mnoho enhancerů je, vzhledem k jejich schopnosti narušit struktury SC, spojováno s cytotoxicitou, podrážděním nebo alergickou reakcí. Esenciální oleje a jejich složky sice snadno pronikají přes kůži až do krevního řečiště, nicméně stejně snadno se vylučují i z těla ven močí nebo výkaly. Nejvyšší míra transdermální absorpce byla zjištěna u limonenu, jež byl získán z grapefruitového oleje. Ukázalo se, že esenciální oleje usnadňují pronikání hydrofilních i lipofilních léčiv s nízkou cytotoxicitou. Současně bylo prokázáno, že toxicita esenciálních olejů a jejich složek je relativně nízká v porovnání se syntetickými zesilovači penetrace, a proto mohou být považovány za bezpečné enhancery pro transdermální podání léčiv [71, s. 478–482].

Rhee a kolektiv [72] studovali transdermální podání ketoprofenu obsaženého v mikroemulzích typu O/V. Ketoprofen je silný nesteroidní protizánětlivý lék, používaný k léčbě revmatoidní dermatitidy a souvisejících nemocí. Při orálním podání však způsobuje nežádoucí vedlejší účinky (podráždění gastrointestinálního traktu), které lze omezit transdermálním podáním. Pro tuto studii byly použity O/V mikroemulze obsahující 3 % ketoprofenu, 15 % oleje, 15 % Labrasolu, 15 % Cremophoru RH 40, a 52 % vody. Olejovou fází postupně tvořily čtyři různé oleje (triacetin, Myvacet (MAG), kyselina olejová, isopropyl myristát). Labrasol a Cremophor RH 40 byly použity jako surfaktanty, a k urychlení transportu ketoprofenu byl použit 5% přírůdek následujících terpenů: limonen, mentol, cineol, kafr. K testování byly použity Franzovy komůrky a kůže o velikosti 5×5 cm byla získána ze hřbetní části potkanů kmene Sprague-Dawley [72, s. 161–164]. Rozpustnost ketoprofenu byla nejvyšší v triacetinu, následně v Myvacetu, kyselině olejové a isopropyl myristátu. Z této studie vyplynulo, že nejrychlejší pronikání ketoprofenu kůží způsobila kyselina olejová, jež je silným enhancerem transdermální penetrace pro mnoho léčiv. Přírůdek terpenů neovlivnil fyzikální vlastnosti mikroemulzní. Nejvýraznější zesilující účinek na rychlost pronikání ketoprofenu kůží byl zaznamenán u limonenu (třikrát rychlejší pronikání ve srovnání se vzorkem bez terpenů), ostatní terpeny neměly na rychlost penetrace vliv [72, s. 164–169].

## 7 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Prvním cílem práce bylo vypracovat literární rešerši na téma stanovení transdermální absorpce kosmetických emulzí *in vitro*, tuto problematiku popsat, a na základě publikovaných dat zpracovat postup pro její stanovení metodou *in vitro*. Rešeršní část práce se rovněž soustředila na obecnou charakterizaci kosmetických emulzí a zaměřila se na popis a charakterizaci emulzí stabilizovaných částicemi (Pickeringovy emulze).

Cílem praktické části bylo připravit a charakterizovat Pickeringovy emulze, obsahující složky esenciálních olejů (limonen, cinnamaldehyd a eugenol), stabilizované nanokrystalickou a mikrofibrilární celulórou, a připravené vzorky emulzí pak následně použít pro testování transdermální absorpce metodou *in vitro* s využitím Franzových difuzních komůrek. Hlavním cílem práce pak bylo stanovit množství uvedených bioaktivních lipofilních látek v jednotlivých vrstvách kůže a posoudit cytotoxicitu připravených emulzí.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 8 MATERIÁL A METODIKA

### 8.1 Přístroje a pomůcky

- Digitální váhy (Kern EW 420-3NM);
- Ultrazvuková čistička (Kraintek K-10LE);
- Chladnička kombinovaná s mrazničkou (Samsung RL39TGCSW1);
- Franzova difuzní komůrka (JM-GLASS, s.r.o.);
- Termostatová lázeň se silikonovými hadičkami (Isotemp 4100 H5P);
- Magnetické nerezové míchadlo typ MIX 15 eco (Unimed);
- Stanice MPA5 (TEWAMETER® TM 300, Courage & Khazaka);
- Magnetická míchačka (Lavot a.s. MM4);
- Ultra-Turrax IKA® T25 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik);
- Laserová difrakce Mastersizer 3000 (Malvern);
- Vortex (Biosan V-1 plus);
- HPLC (Shimadzu DGU-20A5R);
- Chromatografická kolona C18 (X-select, Waters);
- Počítač s programem LCSolution;
- Holicí strojek (Wilkinson Sword Classic), nerezový skalpel (Celimed);
- Transparentní lepicí páska;
- Mikrometr (0–25/0,01 mm, Somet);
- Automatické mikropipety Eppendorf Research® PLUS (Eppendorf);
- Stříkačkové filtry s membránou z PTFE o velikosti pórů 0,2 a 0,45  $\mu\text{m}$  (VWR);
- Běžně používané laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky, pipety, vialky) a další laboratorní vybavení (mikrostříkačky 5 ml, mikrozkuřavky typu Eppendorf 2 ml, špičky pro automatické mikropipety, plastové hokejky, špachtle).

### 8.2 Chemikálie a roztoky

- Receptorová kapalina
  - Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Biosera);
  - Polyoxyetylen (20) oleyl ether 1,5 % (Brij® 98, Sigma Aldrich);
  - Gentamycin sulfát 0,05 % (HiMedia Laboratories);
- Methanol, HPLC grade (99,8+ %  $\text{CH}_3\text{OH}$ , Chem-Lab);

- Acetonitril, HPLC gradient grade (99,9+ % CH<sub>3</sub>CN, Chem-Lab);
- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, p.a. (Penta);
- Voda čištěná reverzní osmózou;
- Standardy esenciálních olejů
  - Cinnamaldehyd (trans-Cinnamaldehyd 99 %, Sigma Aldrich);
  - Limonen ((R)-(+)-Limonen 97 %, Sigma Aldrich);
  - Eugenol (99 %, Sigma Aldrich);
- Nanokrystalická celulóza (Chalmers University of Technology, Göteborg);
- Mikrofibrilární celulóza (Stora Enso);
- MTT kit (Duchefa Biochemie).

### 8.3 Buněčné linie

- Primární myší embryonální fibroblasty (MEF);
- Embryonální myší fibroblasty (ATCC CRL – 1658 NIH-3T3).

### 8.4 Příprava emulzí

K přípravě Pickeringových emulzí byly použity dva typy celulózových částic. Prvním typem byly celulózové nanokrystaly (CNC) s průměrnou délkou  $234 \pm 66$  nm a tloušťkou  $30 \pm 7$  nm, jež byly získány kyselou hydrolyzou komerčně dostupné mikrokystalické celulózy (Avicel<sup>®</sup> PH 101). Druhým typem stabilizujících částic byla vlákna mikrofibrilární celulózy (MFC) (StoraEnso), která měla délku  $> 1$  mm a tloušťku  $> 30$  nm. Jako olejová fáze emulzí byly použity cinnamaldehyd, limonen a eugenol, které nebyly před vlastní emulgací dále upravovány nebo čištěny. Charakteristiky použitých olejů jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Charakteristiky použitých olejů

Olej	M [g/mol]	Hustota [g/cm <sup>3</sup> ]	Rozpustnost v H <sub>2</sub> O [mg/ml]	T <sub>tání</sub> [°C]	T <sub>varu</sub> [°C]	Tenze par [Pa]
<b>Cinnamaldehyd (C)</b>	132,16	1,0497	1,42	-7,5	248	3,853
<b>Limonen (L)</b>	136,24	0,8411	0,014	-74,5	176	264
<b>Eugenol (E)</b>	164,20	1,0652	2,46	-9,2	254	2,946

Pickeringovy emulze typu O/V byly připraveny po smísení příslušného množství oleje, celulózových částic a vody homogenizací pomocí vysokorychlostního homogenizéru Heidolph DX900. Rychlost homogenizace byla nastavena na 24 000 ot./min po dobu 5 min. Množství každého z olejů (cinnamaldehydu, limonenu, nebo eugenolu) v obou typech emulzí bylo 10 % a vodná fáze obsahovala CNC nebo MFC o koncentraci 0,5 % hm. Ke zlepšení emulgačních vlastností byl do vodné suspenze, obsahující CNC, přidán před emulgací 3mM chlorid vápenatý. Metodika přípravy vycházela z postupu uvedeného v publikaci Mikulcové a kol. [73, s. 781–782]. Bezprostředně před každým z testů byla vždy příslušná emulze homogenizována za použití homogenizátoru Ultraturax IKA po dobu 5 min při 14 600 ot./min.

## 8.5 Charakterizace emulzí

Důležitou charakteristikou emulzí je jejich velikost. Ta byla stanovena metodou laserové difrakce, což je běžně využívaná metodika měření velikosti částic v řadě průmyslových odvětví. Je to technika hromadného měření částic, která generuje výsledek pro celý vzorek. Měřící celou kontinuálně prochází částice, na nichž se laserový svazek ohýbá do několika úhlů. Difrakční (ohybový) obraz je pomocí Fourierovy transformace převeden na distribuční křivku, jež obsahuje informace o velikosti částic. Metoda laserové difrakce je velmi rychlá, ale neposkytuje přímý obraz částice. Proto je vhodné výsledky doplnit o mikroskopické snímky [74, s. 8–9], [75, s. 52].

Laserová difrakce byla použita i v případě stanovení velikosti a distribuce částic studovaných emulzí. Měření bylo provedeno na přístroji Mastersizer 3000 s dispergační automatizovanou jednotkou Hydro. Pro difrakční měření byly emulze vzorkovány a suspendovány v proudu disperzního média (demineralizovaná voda), které je dopravilo do měřící cely přístroje. Množství dávkovaného vzorku se řídilo dosažením předepsané hodnoty obskurance, která zajistila vhodný poměr „signál-šum“. Homogenita vzorku v přístroji byla zajištěna zabudovaným míchadlem nastaveným na 2 000 ot./min. Index lomu byl nastaven na 1,421 a teplota měření na 25 °C. Velikost emulzních částic byla vyjádřena jako D [4;3], což je jejich objemově vážený průměr (μm). Každý ze vzorků byl měřen v pěti opakováních. Odlehlé hodnoty měření byly vyloučeny na základě Dean-Dixonova testu extrémních odchylek. Jednotlivé výsledky jsou pak průměry minimálně čtyř stanovení.

Dále byly připravené emulze zhodnoceny pomocí vizuálního pozorování a byl zaznamenán jejich vzhled, barva a potenciální přítomnost neenkapsulovaného oleje na povrchu emulze.

## 8.6 Stanovení transdermální absorpce metodou *in vitro*

Zkouška byla provedena v souladu s nařízením Komise (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolení a omezování chemických látek a dle metodiky OECD 428 (2004) Kožní absorpce: metoda *in vitro* s menšími modifikacemi popsány níže v textu diplomové práce.

### 8.6.1 Biologický materiál

Pro testování byla použita kůže z ušního boltce prasete. Ušní boltce byly získány od prasat, jejichž stáří bylo 100–150 dní, z individuální porážky. Podmínkou bylo získat nepoškozené a nespážené ušní boltce, aby nebyla porušena kožní bariéra, což by mohlo vést ke zkreslení výsledků měření. Ušní boltce byly jednotlivě zabaleny do plastových sáčků a uchovávány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do doby jejich použití. Před experimentem byly zmražené boltce ponechány volně rozmrazit při laboratorní teplotě. Následně byla vnitřní část boltce (Obr. 12) oholena a pomocí skalpelu oddělena od podkladové chrupavky. Tímto způsobem byla získána kůže o plné tloušťce (Obr. 13), včetně *SC*, *epidermis* a *dermis*. Z oddělené kůže byly následně vystříženy vzorky čtvercového tvaru o velikosti  $3\times 3\text{ cm}$ , v jejichž středu byl vyznačen terčík o průměru  $1,5\text{ cm}$  (odpovídající průměru Franzovy komůrky). Tloušťka každého terčíku byla změřena pomocí mikrometru. Takto získané vzorky kůže byly ihned použity k testování.



Obr. 12: Oddělování vnitřní části boltce od chrupavky

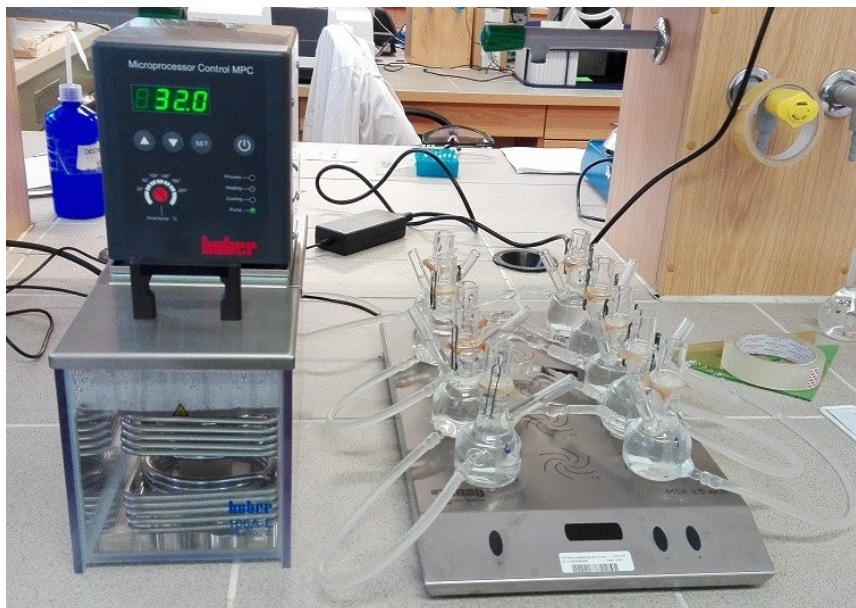




*Obr. 13: Oddělená kůže o plné tloušťce (vpravo)*

### 8.6.2 Aparatura

Na magnetickém míchadle byla sestavena aparatura (Obr. 14) složená z Franzových difuzních komůrek, které byly vzájemně propojeny silikonovými hadičkami. Celý systém byl napojen na vodní lázeň s termostatem, jež udržoval konstantní teplotu  $32 \pm 1$  °C po celou dobu testování. Do dolních (receptorových) částí komůrek byla následně vložena míchadla a komůrky byly po okraj naplněny receptorovou kapalinou. Receptorovou kapalinu tvořil fosfátem pufrovaný fyziologický roztok s 1,5% přídatkem surfaktantu Brij<sup>®</sup> 98 a 0,05% přídatkem gentamycin sulfátu; následně byla receptorová kapalina pomocí ultrazvukové lázně odplyněna. Na povrch dolní části komůrek byly položeny přichystané vzorky prasečí kůže rohovou vrstvou směrem vzhůru tak, aby mezi kůží a receptorovou kapalinou nevznikly žádné vzduchové bubliny. Před nanesením testovaných látek byla kůže ponechána ve styku s receptorovou kapalinou 20–30 min k vyrovnání povrchu a hydratace. Neporušenost kožní membrány byla zkontrolována měřením transepidermální ztráty vody (TEWL).



Obr. 14: Testovací aparatura propojených Franzových komůrek

### 8.6.3 Nanášení testovaných vzorků

Automatickou mikropipetou byly na vyznačený střed kůže naneseny testované vzorky a pomocí plastové hokejky rovnoměrně rozetřeny na celou plochu vyznačeného terčíku. Poté byla přiložena horní (donorová) část komůrky. Horní i dolní část komůrky byly upevněny pomocí gumiček. Pro každý vzorek byly provedeny tři paralelní stanovení. Aplikované množství činilo u složek esenciálních olejů 18  $\mu\text{l}$ , což při použití hodnot hustoty, uvedených v Tab. 1, činilo 18,89 mg pro cinnamaldehyd; 15,14 mg pro limonen a 19,17 mg pro eugenol. V případě emulzí bylo aplikované množství 100  $\mu\text{l}$ . Vzhledem ke skutečnosti, že emulze obsahovaly 10 % olejové složky, činilo nanesené množství olejů z jednotlivých emulzí 10  $\mu\text{l}$ , což odpovídá 10,50 mg pro cinnamaldehyd; 8,41 mg pro limonen a 10,65 mg pro eugenol. Doba expozice činila ve všech případech 24 h.

### 8.6.4 Zpracování kůže

Po ukončení expozice byla každá kůže vyjmuta z Franzových komůrek a rozdělena na jednotlivé frakce, které byly následně podrobeny analýze na přítomnost testované látky. Nejprve byla donorová část komůrky, jež byla v kontaktu s kůží a aplikovanou látkou, opláchnuta 1 ml metanolu (označení vzorku Cap). Následně došlo k vystřížení vnitřního terčíku kůže (Obr. 15), z něhož byly získány další frakce. Nejprve byl získán přebytek nanášené látky, který zůstal na povrchu kůže po expozici, opatrným stěrem pomocí špachtle přeneseným do 1 ml methanolu. Dále byly získány jednotlivé vrstvy SC pomocí tzv. stripování.

Transparentní lepicí páska byla přiložena na kůži a díky tlaku, vyvolanému špachtlí, ulpěla vždy část *SC* na pásce. Celkem bylo získáno 10 stripů, do každé frakce byly použity dva po sobě jdoucí stripy, jež byly vloženy do 1 ml methanolu. Následně byla kůže na několik sekund přiložena na horkou plotnu vařiče. Horkem vytvořený puchýř *epidermis* (Obr. 15) byl pomocí špachtle a pinzety oddělen od *dermis* a převeden do 1 ml methanolu. Zbylá *dermis* byla rozstříhána na malé kousky a také vložena do 1 ml methanolu, totéž bylo provedeno i s kůží z okolí vnitřního terčíku (označení vzorku zbytek). Poslední frakci představovala receptorová kapalina odebraná z akceptorové části komůrky. Všechny frakce byly uchovávány v Eppendorfových mikrozkušavkách při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do doby analýzy.



Obr. 15: Vystřížení vnitřního terčíku kůže (vlevo) a puchýř *epidermis* (vpravo)

#### 8.6.5 Analýza vzorků

Vzorky byly po vytažení z mrazničky nejprve alespoň 24 h ponechány při laboratorní teplotě k rozmrznutí. Následně byly všechny mikrozkušavky po dobu 1 min intenzivně promíchávány na třepačce Vortex, aby se veškerá testovaná látka vyextrahovala do methanolickeho výluhu. Každý výluh byl poté pomocí jehly nasát do stříkačky o objemu 5 ml a přes stříkačkový filtr s velikostí pórů  $0,20\text{ }\mu\text{m}$  (Millipore) přefiltrován do vialky, jež byla následně opatřena septem.

Množství testované látky bylo stanoveno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s využitím následujícího postupu:

- kapalinový chromatograf Shimadzu vybavený DAD detektorem;
- kolona X-select C18 (Waters);
- průtok mobilní fáze  $0,8\text{ ml/min}$ ;
- nastříkované množství vzorku  $20\text{ }\mu\text{l}$ .

Pro kalibraci HPLC byly nejprve z jednotlivých látek připraveny kalibrační standardy o vhodném koncentračním rozmezí (Tab. 2), jež byly analyzovány. Z analýzy standardů vyplynuly retenční časy jednotlivých látek a vlnová délka, při které byla zaznamenána největší odezva (absorbance) příslušné testované látky. To vedlo k upravení např. délky trvání analýzy nebo vhodné vlnové délky pro danou testovanou látku, tyto parametry jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 2: Rozmezí koncentrací kalibračních standardů jednotlivých látek

Testovaná látka	Kalibrační standardy [mg/ml]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
<b>Cinnamaldehyd</b>	0,010	0,050	0,10	0,25	0,50	---
<b>Limonen</b>	0,0022	0,0088	0,020	0,055	0,11	0,20
<b>Eugenol</b>	0,0050	0,0110	0,022	0,050	0,11	0,22

Tab. 3: Parametry HPLC analýzy pro jednotlivé látky

Testovaná látka	Složení mobilní fáze	Vlnová délka [nm]	Délka analýzy [min]
<b>Cinnamaldehyd</b>	Acetonitril : 0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 48 : 52	281	10
<b>Limonen</b>	Methanol : voda 90 : 10	205	11
<b>Eugenol (olej)</b>	Methanol : voda 60 : 40	202	11
<b>Eugenol (emulze)</b>	Acetonitril : voda 50 : 50	202	11

Koncentrace testovaných látek v jednotlivých frakcích kůže byla následně stanovena ze sestavené kalibrační přímky standardů pomocí programu LC Solution.

## 8.7 Stanovení cytotoxicity

Cytotoxicita byla testována u tří vzorků s následujícím složením: 1) disperze nanokrystalů celulózy (CNC), které byly použity jako referenční vzorek; 2) emulze stabilizované nanokrystalickou celulózą s enkapsulovaným limonenem ( $L_{CNC}$ ) a 3) emulze stabilizované nanokrystalickou celulózą obsahující cinnamaldehyd ( $C_{CNC}$ ). Pro stanovení životaschopnosti buněk byla použita metoda MTT. K testování byly současně využity dvě buněčné linie: 1) primární myší embryonální fibroblasty (MEF), a 2) embryonální myší fibroblasty NIH/3T3. Jako kultivační médium bylo pro buněčnou linii NIH/3T3 použito Dulbecco's Modified Eagle Medium, obsahující 10 % telecího séra a  $100 \text{ U ml}^{-1}$  penicilinu/streptomycinu; pro buněčnou linii MEF pak bylo použito stejné médium s přidavkem 20 % telecího séra a  $7 \mu\text{l l}^{-1}$  merkaptoethanolu. Buňky byly inkubovány při  $37^\circ\text{C}$  v prostředí o konstantní vlhkosti a v přítomnosti 5 %  $\text{CO}_2$  v inkubátoru Heracell 150i (ThermoScientific).

Test cytotoxicity byl proveden podle modifikovaného postupu popsaného normou EN ISO 10993-5. Nejprve byly buňky prekultivovány po dobu 24 h v příslušném médiu, které pak bylo nahrazeno jednotlivými Pickeringovými emulzemi zředěnými tak, aby množství obsaženého oleje odpovídalo následujícím koncentracím: 0,05; 0,10; 0,50; 1; 5; 10; 50; 100; 500 a  $1\,000 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Jako reference byla použita suspenze nanokrystalické celulózy bez přítomného oleje. Po přidavku emulzí byly buňky opět 24 h kultivovány v inkubátoru. Cytotoxické působení připravených emulzí bylo provedeno pomocí testu MTT. Po výše zmíněné 24h kultivaci byly emulze z buněk odsáty, bylo přidáno čisté médium a MTT o koncentraci  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  média. Buňky s MTT byly opět po dobu 4 h kultivovány. Množství živých buněk bylo stanoveno pomocí spektrofotometru a absorbance byla měřena při vlnové délce  $\lambda = 570 \text{ nm}$ . Všechny testy byly provedeny ve čtyřech opakováních. V souladu s požadavky ISO 10993-5 byly výsledky cytotoxického působení emulzí vyhodnoceny následujícím způsobem:

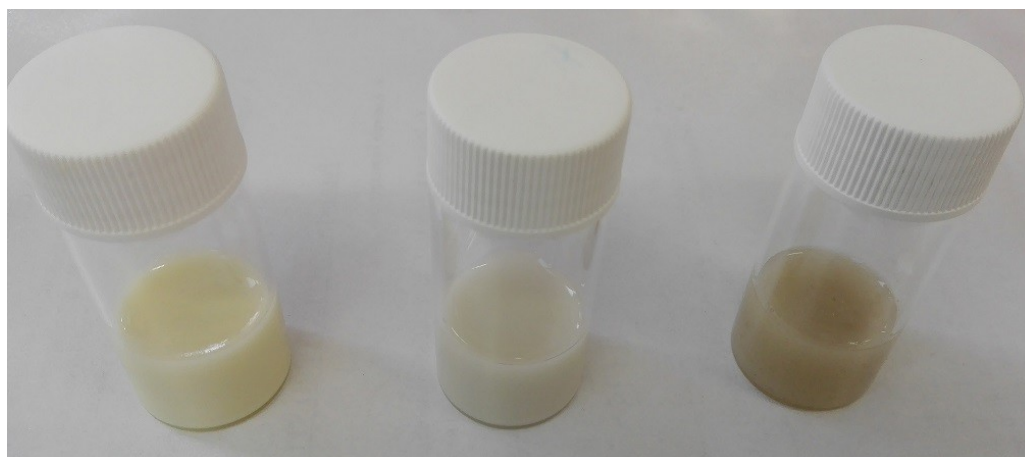
- necytotoxický účinek: množství životaschopných buněk vyšší než 80 %;
- slabě cytotoxický účinek: množství životaschopných buněk 60 – 80 %;
- středně cytotoxický účinek: množství životaschopných buněk 40 – 60 %;
- silně cytotoxický účinek: množství životaschopných buněk menší než 40 %.

Změna morfologie buněk po působení Pickeringových emulzí byla dále hodnocena vizuálně pomocí inverzního mikroskopu s fázovým kontrastem Olympus (IX 81).

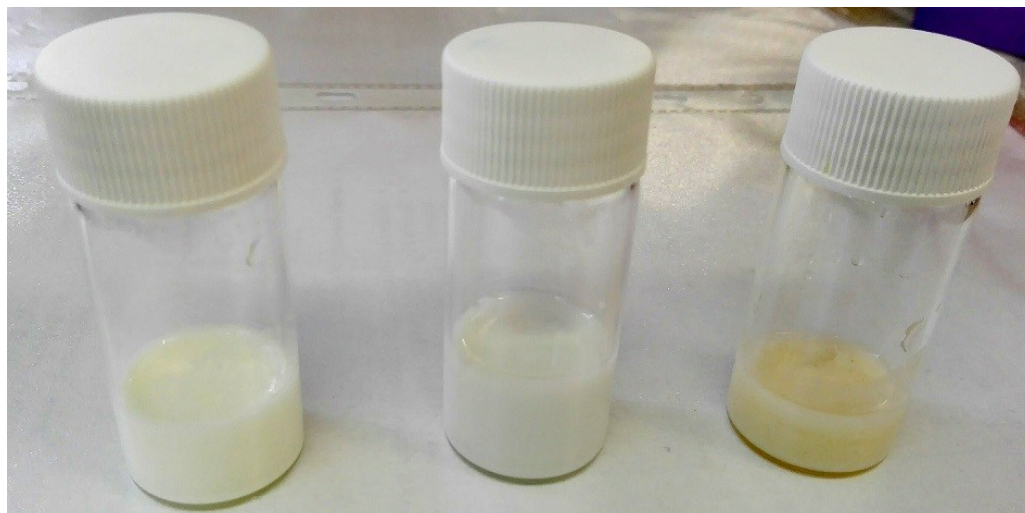
## 9 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 9.1 Příprava a charakterizace emulzí

Příprava emulzí vycházela z postupu publikovaného Mikulcovou a kol. [73, s. 781–782]. K přípravě byly použity tři složky různých esenciálních olejů, cinnamaldehyd (skořicový olej), limonen (citronový olej) a eugenol (hřebíčkový olej), v množství 10 % hm. Emulze byly stabilizovány pomocí 0,5 % MFC nebo CNC. Vzhled připravených emulzí je ilustrován na Obr. 16 a Obr. 17. Z obrázků a z provedeného vizuálního hodnocení je zřejmé, že vzorky byly homogenní, a po přípravě nevykazovaly známky sedimentace nebo krémování. Vizuální hodnocení rovněž ukázalo, že u emulzí obsahujících eugenol nedošlo k úplné enkapsulaci oleje, a na jejím povrchu byla zaznamenána přítomnost volného eugenolu, jak v případě stabilizace pomocí MFC, tak CNC. To odpovídá zjištěním uvedeným ve výše jmenované publikaci.



*Obr. 16: Emulze stabilizované CNC, zleva cinnamaldehyd, limonen a eugenol*



Obr. 17: Emulze stabilizované MFC, zleva cinnamaldehyd, limonen a eugenol

Pro charakterizaci všech emulzí byla pomocí laserové difrakce změřena velikost emulzních částic a jejich distribuce. Naměřené velikosti částic jednotlivých emulzí, stabilizovaných pomocí CNC i MFC jsou vyjádřeny jako objemově vážené průměry  $D[4;3]$  a jsou uvedeny v Tab. 4.

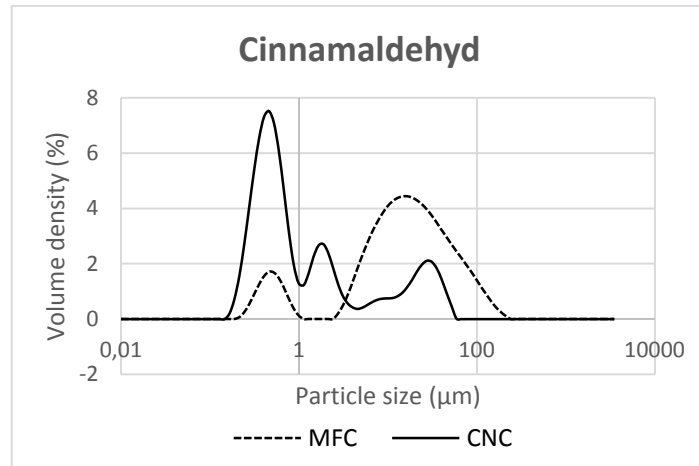
Tab. 4: Hodnoty velikostí částic  $D[4;3]$  jednotlivých emulzí stanovené laserovou difrakcí (olejová fáze: C = cinnamaldehyd, L = limonen, E = eugenol)

Typ emulze	CNC			MFC		
	C	L	E	C	L	E
	22,40*	12,20	31,10*	29,4	35,9	33,9
	13,10	12,30	24,00	28,8	33,5	32,3
<b>Velikost částic [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	6,08	12,30	15,20	28,2	32,4	34,0
	3,11	12,30	7,90	28,1	31,4	34,5
	2,25*	12,30	5,71*	28,4	30,8	34,7
<b>Průměr <math>\pm</math> SD</b>	$7 \pm 5$	$12 \pm 0$	$16 \pm 8$	$29 \pm 1$	$33 \pm 2$	$34 \pm 1$

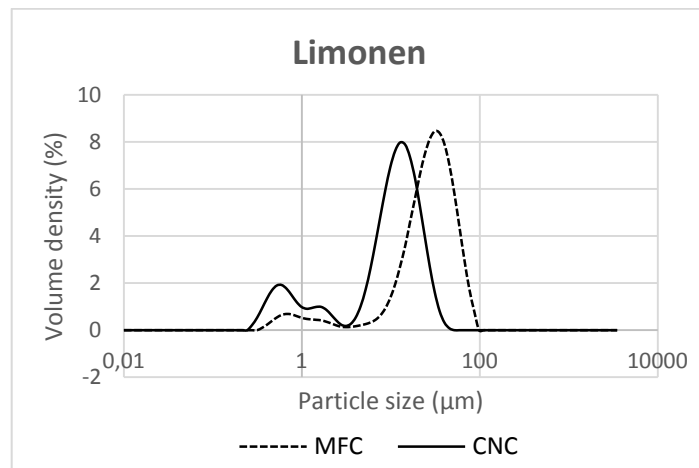
\*Hodnoty nejsou zahrnuty do vypočtených průměrných hodnot. Hodnoty byly vyloučeny na základě Dean-Dixonova testu extrémních odchylek.

Na základě provedených měření lze konstatovat, že emulze stabilizované pomocí CNC obsahovaly částice menších rozměrů, než emulze stabilizované pomocí MFC. Z Tab. 4 je např. zřejmé, že velikost emulzních částic byla v případě emulze cinnamaldehydu stabilizované pomocí MFC ( $28,4 \pm 0,3$ )  $\mu\text{m}$ , zatímco stejná emulze stabilizovaná pomocí CNC obsahovala částice s průměrnou velikostí ( $7 \pm 5$ )  $\mu\text{m}$ , avšak naměřené hodnoty ukazují, že rozptyl mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou  $D[4;3]$  byl poměrně velký. Průměrná hodnota byla proto stanovena po vyloučení odlehlé hodnoty, které bylo provedeno pomocí Dean-Dixonova testu extrémních odchylek. Srovnání distribučních křivek obou emulzí udává Obr. 18. V emulzích obsahujících limonen se nacházejí částice s velikostí ( $12 \pm 0$ )  $\mu\text{m}$  (emulze stabilizovaná pomocí CNC) a ( $33 \pm 2$ )  $\mu\text{m}$  v emulzi stabilizované pomocí MFC. Obr. 19 uvádí srovnání distribučních křivek těchto emulzí. V případě eugenolu byla velikost emulzních částic relativně stálá u emulze stabilizované pomocí MFC a činila ( $34 \pm 1$ )  $\mu\text{m}$ , v případě emulze stabilizované pomocí CNC byl opět zaznamenán značný rozptyl mezi nejnižší a nejvyšší naměřenou hodnotou, a průměrná hodnota velikosti emulzních částic byla ( $16 \pm 8$ )  $\mu\text{m}$ . Srovnání distribučních křivek obou typů emulzí s eugenolem je uvedeno na Obr. 20. Z naměřených hodnot také vyplývá, že velikost částic emulzí je rovněž ovlivněna typem použitého oleje. Emulze obsahující cinnamaldehyd, stabilizované jak CNC, tak MFC, tvoří částice s nejmenší velikostí, na rozdíl od emulzí obsahujících eugenol, jež obsahují částice největších průměrů. Rozdíl ve velikosti emulzních částic stabilizovaných MFC nebo CNC byl rovněž pozorován v publikaci Mikulcové a kol. [73, s. 783] a byl vysvětlen skutečností, že CNC s kratšími vlákny tvoří na povrchu emulzní částice plochou monovrstvou, která umožní lepší zakřivení olejové kapky, a tím i tvorbu emulzních částic s menší velikostí. Ve srovnání s touto situací jsou vlákna MFC výrazně delší, neumožňují tak vysoké zakřivení, a emulzní částice jsou pak větší.

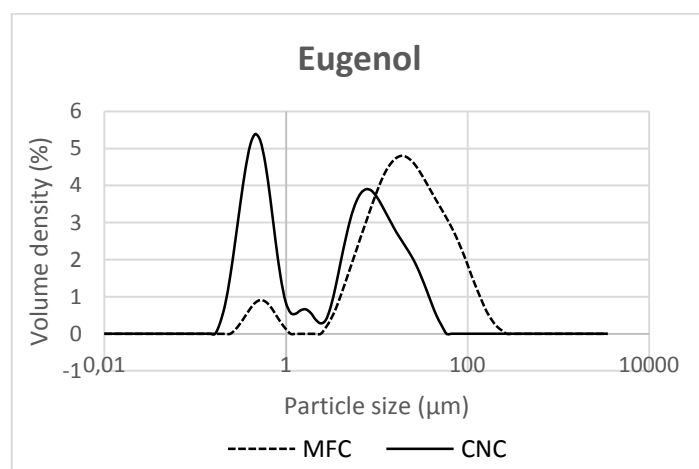




Obr. 18: Srovnání distribučních křivek emulzí stabilizovaných MFC a CNC obsahujících cinnamaldehyd



Obr. 19: Srovnání distribučních křivek emulzí stabilizovaných MFC a CNC obsahujících limonen



Obr. 20: Srovnání distribučních křivek emulzí stabilizovaných MFC a CNC obsahujících eugenol

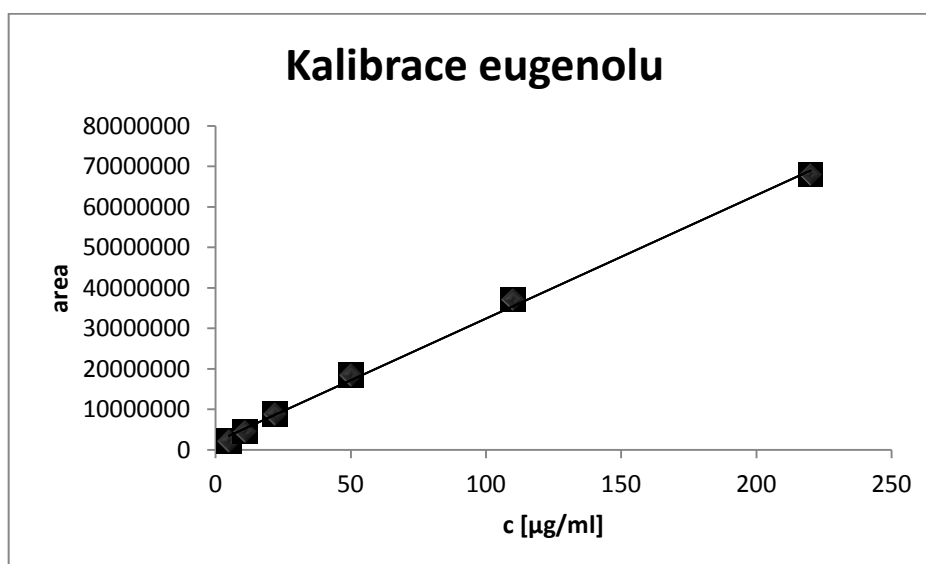
## 9.2 HPLC analýza

Všechny připravené vialky se vzorky byly podrobeny HPLC analýze pro stanovení množství testované látky v jednotlivých kožních vrstvách. K analýze byl použit kapalinový chromatograf Shimadzu vybavený DAD detektorem s kolonou C18. Podmínky testování byly nastaveny podle postupu, jenž byl popsán výše. Pro kalibraci HPLC byly nejprve z jednotlivých látek připraveny kalibrační standardy o vhodném koncentračním rozmezí, následně byly sestrojeny kalibrační přímky pro jednotlivé látky, jež jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Rovnice kalibračních přímek pro jednotlivé testované látky

Testovaná látka	Rovnice kalibrační přímky	
<b>Cinnamaldehyd</b>	$y = 4,0442 \cdot 10^{-5}x - 0,2606$	$R^2 = 0,999$
<b>Limonen</b>	$y = 1,9948 \cdot 10^{-5}x - 2,5398$	$R^2 = 0,999$
<b>Eugenol</b>	$y = 3 \cdot 10^{-6}x - 5,9831$	$R^2 = 0,998$

Výsledná koncentrace testovaných látek v jednotlivých frakcích kůže byla stanovena ze sestrojené kalibrační přímky standardů pomocí programu LC Solution. Na Obr. 21 je jako příklad uvedena kalibrační přímka eugenolu.



Obr. 21: Kalibrační přímka eugenolu

### 9.3 Transdermální absorpce

Pomocí HPLC bylo stanoveno množství bioaktivních lipofilních látek (cinnamaldehyd, limonen a eugenol) v jednotlivých vrstvách kůže. Látky byly testovány jak samotné, tak po enkapsulaci do emulzí stabilizovaných pomocí CNC nebo MFC.

#### 9.3.1 Transepidermální ztráta vody (TEWL)

Kvalita použitých vzorků kůže ve smyslu neporušenosti kožní membrány byla ověřena měřením hodnot transepidermální ztráty vody. Vzorky byly hodnoceny v souladu se stupnicí použitého Tewametru, kde TEWL 0 – 9 g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> představuje velmi dobrý stav pokožky, 10 – 14 g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> dobrý stav pokožky a 15 – 25 g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> její normální stav. Vyšší hodnoty pak značí napjatý (26 – 29 g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>) a kritický stav (nad 30 g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>). Pro stanovení transdermální absorpce byly použity vzorky kůže, jejichž hodnoty TEWL ležely v intervalu 13 – 16 g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> při testování samotných látek, 9 – 13 g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> při testování emulzí stabilizovaných pomocí MFC, a 12 – 18 g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> při testování emulzí stabilizovaných pomocí CNC. Uvedená měření svědčí o skutečnosti, že všechny použité vzorky odpovídaly velmi dobrému a dobrému stavu kůže s neporušenou bariérovou funkcí.

#### 9.3.2 Transdermální absorpce cinnamaldehydu a jeho emulzí

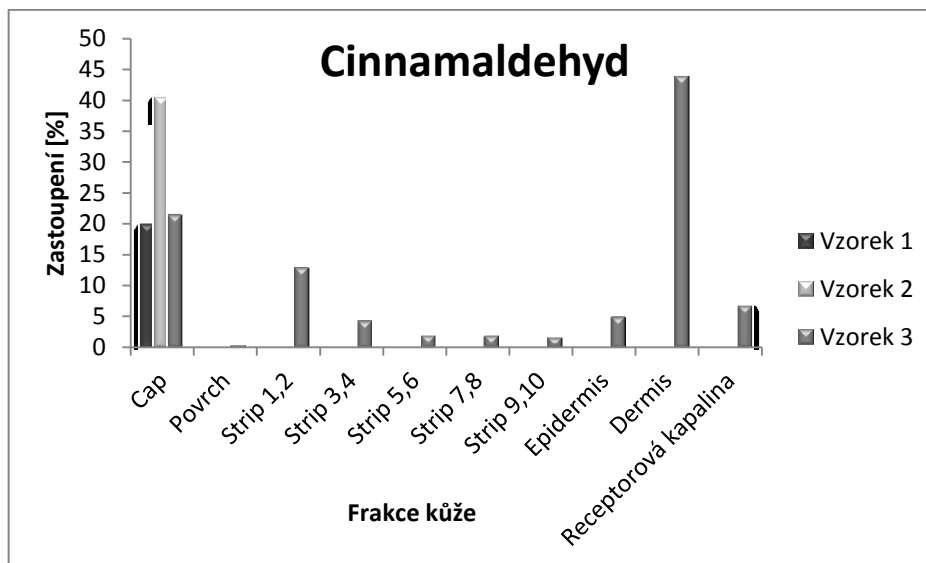
Transdermální absorpce cinnamaldehydu i jeho emulzí byla testována vždy ve třech paralelních stanoveních. Výsledné koncentrace včetně procentuálního zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních vrstvách jsou uvedeny v následujících tabulkách. V Tab. 6 jsou uvedeny výsledky pro samotný cinnamaldehyd, v Tab. 7 pro cinnamaldehyd obsažený v emulzi stabilizované pomocí CNC a v Tab. 8 pro cinnamaldehyd obsažený v emulzi stabilizované pomocí MFC.

Tab. 6: Koncentrace a procentuální zastoupení cinnamaldehydu (C) v jednotlivých frakcích kůže ( $n = 3$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]			Zastoupení [%]		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Cap <sup>a)</sup>	578	936	624	19,9	40,5	21,4
Povrch	242	7	11	8,3	0,3	0,4
Strip 1,2	1030	423	377	35,4	18,3	12,9
Strip 3,4	310	228	128	10,6	9,9	4,4
Strip 5,6	203	98	59	7,0	4,2	2,0
Strip 7,8	81	39	58	2,8	1,7	1,9
Strip 9,10	133	42	49	4,6	1,8	1,7
Epidermis	21	10	145	0,7	0,4	4,9
Dermis	112	317	1275	3,9	13,7	43,6
Receptorová kapalina	199	213	199	6,8	9,2	6,8
Zbytek	8746	9063	14271	---	---	---
<b>Celkové množství</b>	11655	11376	17196		100	

<sup>a)</sup>Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky

Z naměřených výsledků vyplývá, že největší koncentrace cinnamaldehydu se nacházela na donorové části Franzovy komůrky (Cap), jež byla v kontaktu s kůží a nanášenou látkou, a v prvních dvou kožních stripech. V dalších vrstvách kůže už jeho koncentrace úměrně klesala a až do receptorové kapaliny prošlo jen malé množství cinnamaldehydu, jak lze vidět i na Obr. 22. Celková návratnost cinnamaldehydu však byla u vzorků C1 a C2 jen 62 % a 60 %, pouze u vzorku C3 dosáhla 91 %, což odpovídá doporučení WHO.



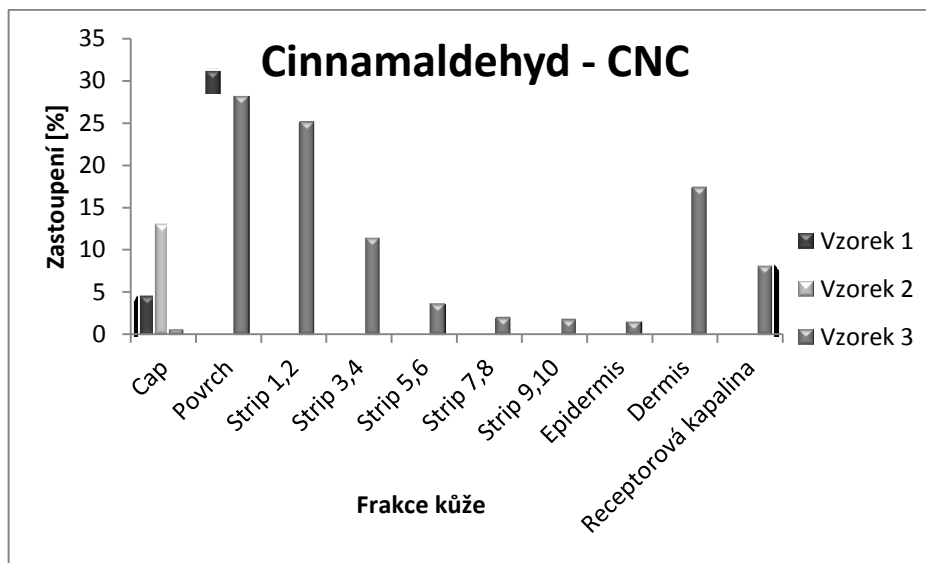
Obr. 22: Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních frakcích

V případě emulze stabilizované pomocí CNC (Tab. 7) se největší množství cinnamaldehydu nacházelo na povrchu kůže, vůbec tak neprošlo kožní membránou, a v prvních dvou kožních stripech. Stejně jako v případě samotného cinnamaldehydu, i v tomto případě se jeho množství v dalších vrstvách snižovalo, a značné množství prošlo dokonce až do dermis. Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých vrstvách je znázorněno na Obr. 23. Celková návratnost cinnamaldehydu, prošlého z emulze stabilizované pomocí CNC, byla u všech tří vzorků vyšší než 80 %. Pro vzorek C2<sub>CNC</sub> návratnost činila 83 %, pro vzorek C3<sub>CNC</sub> činila 81 % a nejvyšší byla u vzorku C1<sub>CNC</sub>, kde činila dokonce 100 %.

Tab. 7: Koncentrace a procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované CNC ( $n = 3$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]			Zastoupení [%]		
	C1 <sub>CNC</sub>	C2 <sub>CNC</sub>	C3 <sub>CNC</sub>	C1 <sub>CNC</sub>	C2 <sub>CNC</sub>	C3 <sub>CNC</sub>
Cap <sup>a)</sup>	1312	48	335	13,0	0,6	4,6
Povrch	2184	2132	2263	21,7	28,1	31,1
Strip 1,2	1927	1902	1746	19,1	25,1	24,0
Strip 3,4	1141	869	0	11,3	11,5	0,0
Strip 5,6	562	280	641	5,6	3,7	8,8
Strip 7,8	402	155	0	3,9	2,1	0,0
Strip 9,10	279	138	157	2,8	1,8	2,1
Epidermis	82	120	94	0,7	1,6	1,3
Dermis	1529	1322	1505	15,2	17,4	20,7
Receptorová kapalina	675	617	542	6,7	8,1	7,4
Zbytek	440	1096	1204	---	---	---
<b>Celkové množství</b>	<b>10533</b>	<b>8679</b>	<b>8487</b>		<b>100</b>	

<sup>a)</sup>Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky



Obr. 23: Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované CNC

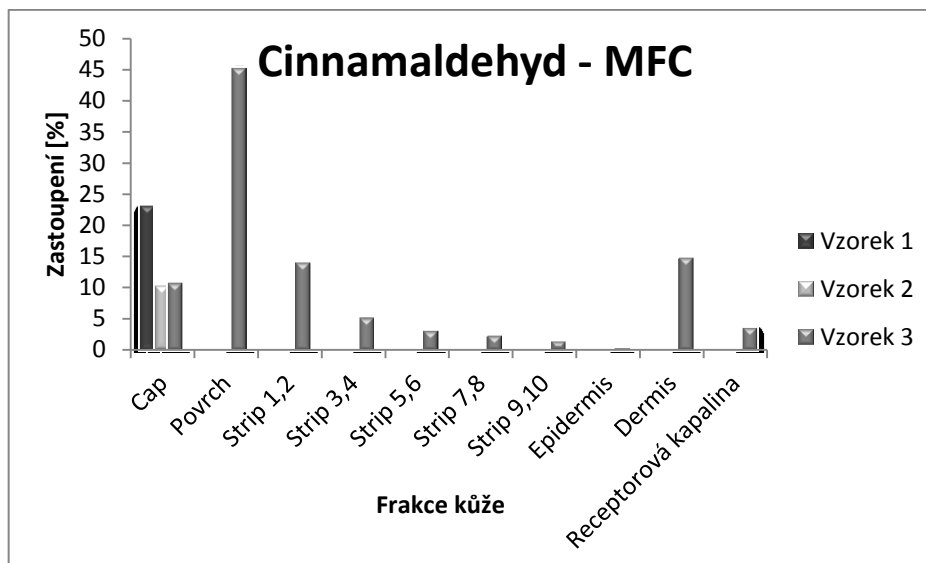
Stejně jako v případě předchozí emulze s obsahem CNC, i v případě emulze stabilizované MFC bylo největší množství cinnamaldehydu obsaženo na povrchu vzorku, a vůbec tak neprošlo kožní membránou (Tab. 8). V prvních dvou stripech už bylo jeho množství nižší, a v následujících kožních vrstvách se cinnamaldehyd téměř nevyskytoval. Nicméně i z této emulze cinnamaldehyd ve značném množství penetroval až do dermis, jak lze vidět na Obr. 24. Celková návratnost cinnamaldehydu z emulze stabilizované pomocí MFC byla u všech tří vzorků velmi dobrá. U vzorku C1<sub>MFC</sub> činila návratnost 87 % a odpovídala tak doporučení SCCP, u dalších dvou vzorků odpovídala doporučení WHO, protože činila 95 % v případě vzorku C2<sub>MFC</sub> a 91 % u vzorku C3<sub>MFC</sub>.

Tab. 8: Koncentrace a procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované MFC ( $n = 3$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]			Zastoupení [%]		
	$C1_{\text{MFC}}$	$C2_{\text{MFC}}$	$C3_{\text{MFC}}$	$C1_{\text{MFC}}$	$C2_{\text{MFC}}$	$C3_{\text{MFC}}$
Cap <sup>a)</sup>	2059	917	859	23,1	10,3	10,7
Povrch	2914	3419	3627	32,7	38,4	45,1
Strip 1,2	1006	1050	1123	11,3	11,8	14,0
Strip 3,4	434	655	411	4,9	7,3	5,1
Strip 5,6	293	269	243	3,3	3,0	3,0
Strip 7,8	208	195	183	2,3	2,2	2,3
Strip 9,10	136	124	110	1,5	1,4	1,4
Epidermis	176	511	16	1,9	5,7	0,2
Dermis	1471	1498	1186	16,5	16,8	14,7
Receptorová kapalina	227	274	284	2,5	3,1	3,5
Zbytek	260	1056	1549	---	---	---
<b>Celkové množství</b>	9184	9968	9591		100	

<sup>a)</sup> Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky

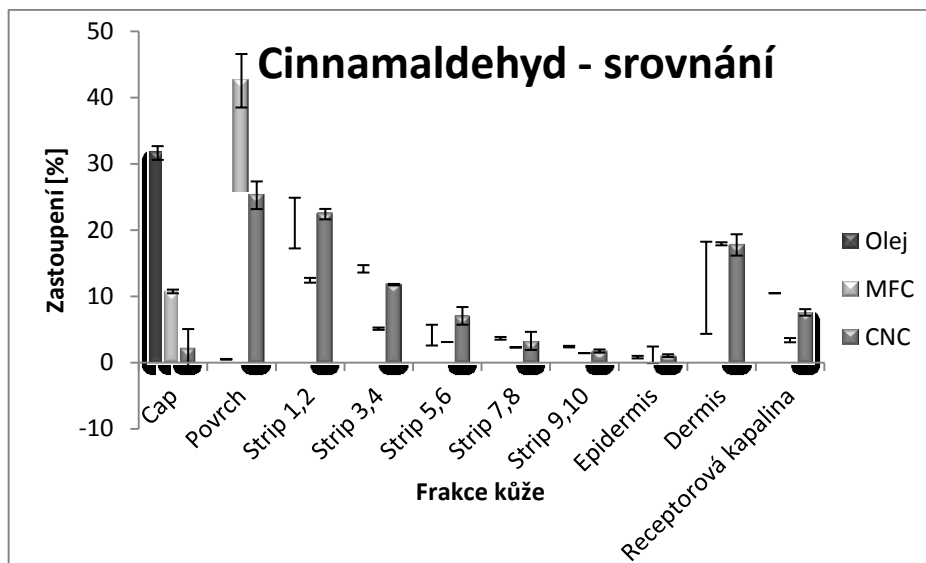




Obr. 24: Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované MFC

### 9.3.2.1 Porovnání transdermální absorpce cinnamaldehydu

Na závěr byly srovnány hodnoty, stanovené v jednotlivých vrstvách kůže, získané testováním samotného cinnamaldehydu a cinnamaldehydu obsaženého v emulzích stabilizovaných pomocí CNC a pomocí MFC. Tyto výsledky jsou zobrazeny na Obr. 25. Na obrázku jsou vyznačeny průměrné hodnoty včetně směrodatných odchylek měření, které byly získány vždy po vyloučení odlehlých hodnot. Z tohoto obrázku je zřejmé, že cinnamaldehyd obsažený v emulzích obou typů nejvíce zůstává na kožním povrchu a do hlubších kožních vrstev proniká v menším množství, než je tomu u samotného oleje. Ten nejvíce zůstává na povrchu donorové části Franzovy komůrky (Cap) a jeho množství v hlubších kožních vrstvách se postupně snižuje. Množství cinnamaldehydu prošlého až do dermis je ale vyšší u emulzí, a naopak je tomu u receptorové kapaliny, kde se nachází vyšší množství samotného oleje. Výsledky rovněž naznačují, že rovněž existuje rozdíl mezi chováním cinnamaldehydu enkapsulovaného do emulzí stabilizovaných pomocí MFC a CNC. V případě MFC emulze je množství cinnamaldehydu, který zůstává na povrchu kůže výrazně vyšší, než je tomu v případě emulze stabilizované CNC a činí  $(3\,330 \pm 317)$   $\mu\text{g}$  pro emulzi s MFC a  $(2\,190 \pm 66)$   $\mu\text{g}$  pro emulzi stabilizovanou CNC. Tuto skutečnost je možné vysvětlit rozdílným charakterem částic CNC a MFC. Lze se domnívat, že delší vlákna MFC, která zůstávají na povrchu kožního vzorku, mohou tvořit ochrannou vrstvu bránící pronikání cinnamaldehydu do hlubších vrstev kůže.



Obr. 25: Srovnání množství cinnamaldehydu v kožních frakcích podle typu použitého vzorku

Transdermální absorpci cinnamaldehydu se věnují i studie publikované v literatuře. Práce Smithové a kol. [76, s. 193] se zabývá absorpcí cinnamaldehydu a cinnamyl alkoholu metabolicky aktivní lidskou kůží pomocí metody *in vitro*. V práci je rovněž studován metabolismus těchto látek. Autoři zjistili, že nejvíce cinnamaldehydu, a to 66 % aplikované dávky, zůstalo neabsorbováno na povrchu kůže, 6,6 % bylo nalezeno v kůži a 9,4 % v receptorové kapalině. Vzhledem k tomu, že byla použita metabolicky aktivní kůže, došlo k enzymatické biotransformaci cinnamaldehydu na cinnamyl alkohol a kyselinu skořicovou. Bylo zjištěno, že biotransformace probíhá za působení alkoholdehydrogenázy a aldehyddehydrogenázy. Dalším zajímavým poznatkem této studie bylo, že předúprava kožních vzorků 20  $\mu$ l vody měla za následek zvýšení transdermální absorpce. Celková návratnost cinnamaldehydu a jeho metabolitů byla 83 %.

Souhrnná data, týkající se transdermální absorpce cinnamaldehydu, cinnamyl alkoholu a kyseliny skořicové, představili rovněž Bickers a kol. [77, s. 802]. Tato obsáhlá práce se věnuje rovněž jejich toxikologii a dermatologickému hodnocení. Jmenovaní autoři shrnuli dostupné publikované údaje o transdermální absorpci *in vivo* a *in vitro* na různých kožních modelech. Například při použití modelového systému krysí kůže bylo zaznamenáno, že tato kůže absorbovala 34 % cinnamaldehydu za podmínek bez okluze a 42 % při okluzi.

### 9.3.3 Transdermální absorpce limonenu a jeho emulzí

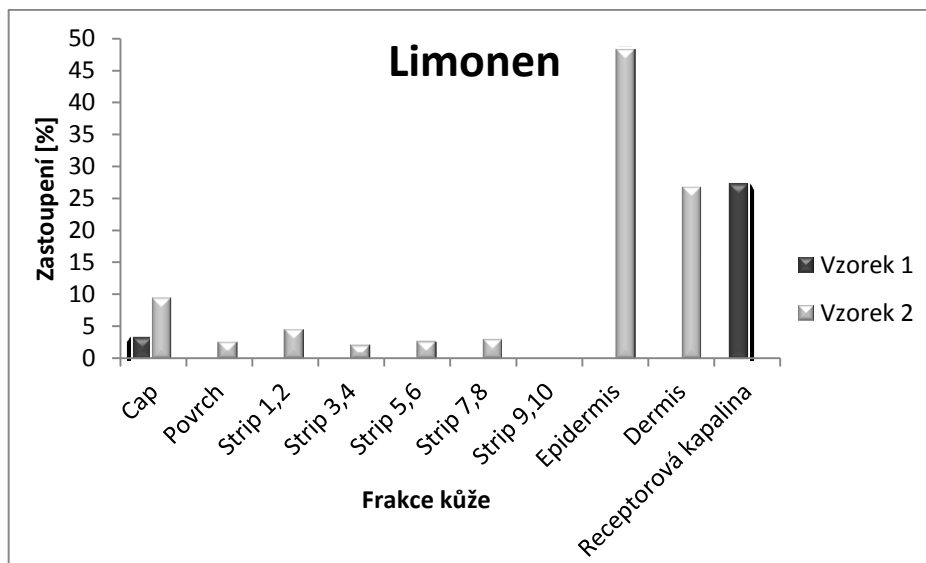
Transdermální absorpce limonenu byla testována ve dvou paralelních stanoveních, u jeho emulzí byla provedena tři paralelní stanovení, a výsledné koncentrace včetně procentuálního zastoupení limonenu v jednotlivých kožních vrstvách jsou uvedeny v Tab. 9 (samotný limonen), v Tab. 10 (limonen obsažený v emulzi stabilizované pomocí CNC), a v Tab. 11 (limonen obsažený v emulzi stabilizované pomocí MFC).

Tab. 9: Koncentrace a procentuální zastoupení limonenu (L) v jednotlivých frakcích kůže ( $n = 2$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Zastoupení [%]	
	L1	L2	L1	L2
Cap <sup>a)</sup>	3	4	3,3	9,6
Povrch	2	1	1,8	2,7
Strip 1,2	2	2	2,3	4,6
Strip 3,4	3	1	2,6	2,2
Strip 5,6	1	1	1,3	2,7
Strip 7,8	7	1	7,4	3,1
Strip 9,10	1	0	1,0	0,0
Epidermis	17	19	16,7	48,3
Dermis	36	10	36,4	26,8
Receptorová kapalina	27	0	27,2	0,0
Zbytek	95	85	---	---
<b>Celkové množství</b>	194	124	100	

<sup>a)</sup>Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky

Z naměřených výsledků vyplývá, že se v kožních frakcích nacházelo jen malé množství limonenu, a téměř všechen prošel až do nejnižších vrstev kůže, epidermis a hlavně dermis. Tyto výsledky jsou znázorněny na Obr. 26. Celková návratnost limonenu však byla velmi nízká, pouze 1 % z aplikované dávky u obou stanovení.



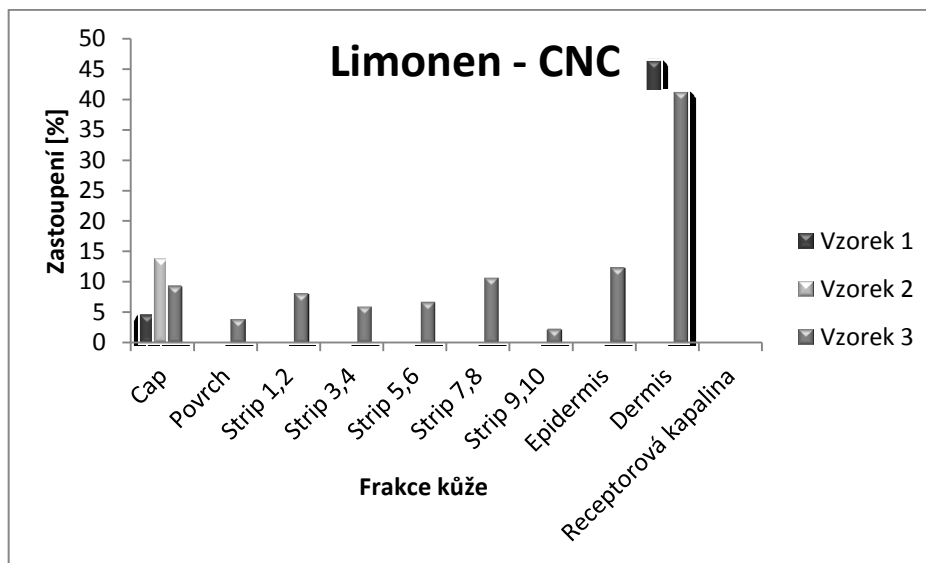
Obr. 26: Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních frakcích

V případě emulze stabilizované pomocí CNC (Tab. 10) už bylo množství limonenu v jednotlivých kožních vrstvách větší, než u samotného esenciálního oleje. Větší množství se nacházelo v epidermis a opět bylo největší množství (kolem 40 %) v dermis, jak zobrazuje Obr. 27. I v tomto případě byla celková návratnost limonenu pouze 1 % u všech stanovení.

Tab. 10: Koncentrace a procentuální zastoupení limonenu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované CNC ( $n = 3$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]			Zastoupení [%]		
	L1 <sub>CNC</sub>	L2 <sub>CNC</sub>	L3 <sub>CNC</sub>	L1 <sub>CNC</sub>	L2 <sub>CNC</sub>	L3 <sub>CNC</sub>
Cap <sup>a)</sup>	3	9	7	4,6	13,8	9,3
Povrch	4	4	3	6,9	6,5	3,8
Strip 1,2	3	7	6	4,9	10,1	8,1
Strip 3,4	7	2	4	12,6	3,7	6,0
Strip 5,6	1	2	5	2,5	3,3	6,6
Strip 7,8	3	0	8	5,2	0,0	10,7
Strip 9,10	1	5	2	1,6	8,4	2,2
Epidermis	9	10	9	15,5	14,8	12,3
Dermis	27	26	30	46,2	39,4	41
Receptorová kapalina	0	0	0	0,0	0,0	0,0
Zbytek	2	44	24	---	---	---
<b>Celkové množství</b>	60	107	98		100	

<sup>a)</sup>Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky



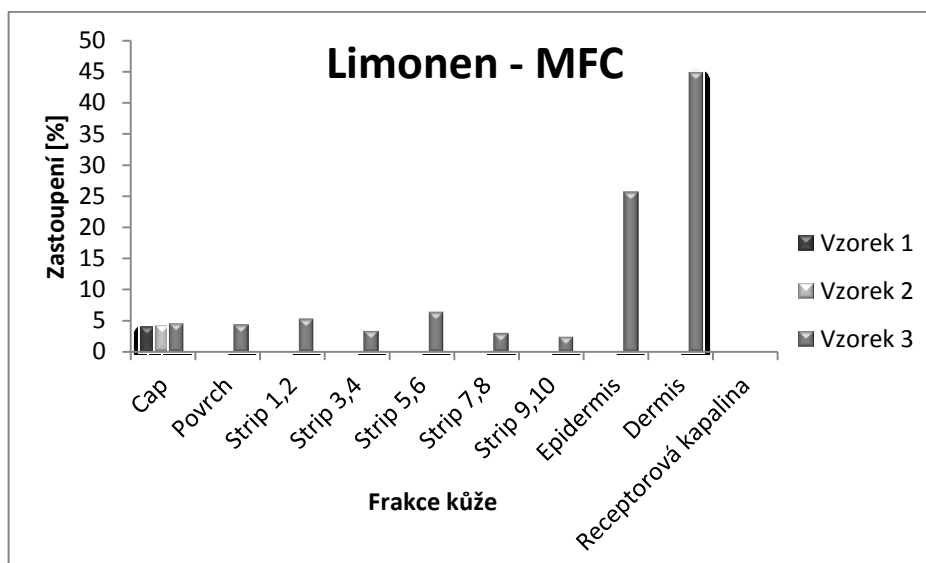
Obr. 27: Procentuální zastoupení limonenu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované CNC

Naměřené výsledky u emulze stabilizované pomocí MFC (Tab. 11) byly podobné výsledkům z měření samotného esenciálního oleje. Ve všech kožních vrstvách se nacházelo malé množství limonenu, a téměř všude limonen byl v epidermis a dermis, jak znázorňuje Obr. 28. Procentuální zastoupení limonenu v dermis bylo v tomto případě stejné, jako v případě emulze stabilizované pomocí CNC. Celková návratnost limonenu byla i v tomto případě velmi nízká, a to 1 % u vzorku L1<sub>MFC</sub> a 2 % u dalších dvou vzorků.

Tab. 11: Koncentrace a procentuální zastoupení limonenu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované MFC ( $n = 3$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]			Zastoupení [%]		
	L1 <sub>MFC</sub>	L2 <sub>MFC</sub>	L3 <sub>MFC</sub>	L1 <sub>MFC</sub>	L2 <sub>MFC</sub>	L3 <sub>MFC</sub>
Cap <sup>a)</sup>	3	4	5	4,1	4,3	4,6
Povrch	4	7	4	5,6	7,9	4,4
Strip 1,2	0	7	5	0,0	8,3	5,3
Strip 3,4	4	4	3	5,2	5,1	3,4
Strip 5,6	3	4	7	4,3	5,1	6,4
Strip 7,8	4	4	3	5,5	4,2	3,0
Strip 9,10	4	6	3	5,9	6,7	2,5
Epidermis	25	14	26	32,6	15,9	25,6
Dermis	28	37	46	36,8	42,5	44,8
Receptorová kapalina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Zbytek	14	51	31	---	---	---
<b>Celkové množství</b>	89	138	133		100	

<sup>a)</sup>Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky

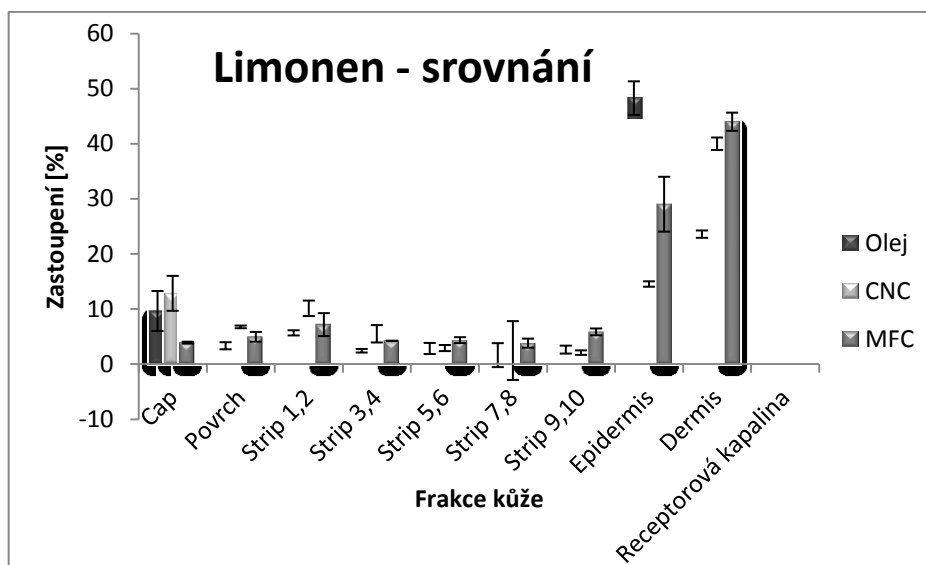


Obr. 28: Procentuální zastoupení limonenu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci z emulze stabilizované MFC

### 9.3.3.1 Porovnání transdermální absorpce limonenu

Hodnoty, stanovené v jednotlivých vrstvách kůže, získané testováním samotného limonenu a limonenu obsaženého v emulzích stabilizovaných pomocí CNC a MFC byly na závěr srovnány a výsledky jsou zobrazeny na Obr. 29. Toto srovnání bylo provedeno i přesto, že návratnost stanovení byla nízká. Cílem srovnání však bylo zhodnotit, do jaké hloubky limonen, který již pronikne do kůže, penetruje, a posoudit, jestli se chová odlišně, pokud je volný, a pokud je enkapsulován ve studovaných emulzích. Vyznačené průměrné hodnoty včetně směrodatných odchylek měření byly získány vždy po vyloučení odlehlých hodnot. Z tohoto obrázku vyplývá, že výrazný rozdíl ve výsledcích samotného limonenu a emulzí obou typů není. Ve všech třech případech prochází největší množství limonenu až do hlubších kožních vrstev. Rozdílem mezi samotným olejem a olejem enkapsulovaným do emulzí je v tom, že samotný olej je více obsažen v epidermis, a limonen z obou typů emulzí je nejvíce zastoupen v dermis. Z výsledků je patrné, že existuje rozdíl v chování i mezi limonenem enkapsulovaným do emulzí stabilizovaných pomocí CNC a MFC. V případě emulze stabilizované pomocí CNC se v epidermis nachází nižší množství limonenu ( $9 \pm 1$ )  $\mu\text{g}$ , než je tomu u emulze stabilizované pomocí MFC ( $22 \pm 7$ )  $\mu\text{g}$ . Tuto skutečnost je možné vysvětlit rozdílným charakterem částic CNC a MFC.





Obr. 29: Srovnání množství limonenu v kožních frakcích podle typu použitého vzorku

Výše uvedené výsledky této diplomové práce ukazují, že při námi provedených experimentech byla návratnost limonenu, ať už samotného oleje, či oleje v emulzích, velmi nízká. Proto byla provedena literární studie s cílem alespoň částečně objasnit důvod tohoto chování. Ze studie vyplynulo, že limonen se na vlhkém vzduchu snadno oxiduje prostřednictvím volných radikálů, ze kterých vzniká směs šesti nestabilních hydroperoxidů. Ty pak dávají vzniknout sekundárním oxidačním produktům. Studii oxidace limonenu provedli Pokorný a kol. [78, s. 667], kteří zahřívali limonen při teplotě 40 °C za přítomnosti omezeného množství kyslíku. Degradční produkty byly stanoveny pomocí plynové chromatografie. Po 20h namáhání byly jako produkty oxidace zjištěny, mimo jiné, karvon, karveol, limonen oxid, či p-cymen.

Uvedené informace naznačují, že při 24h namáhání limonenu během stanovení transdermální absorpce, které probíhá při 32 °C za přítomnosti vlhkosti a vzdušného kyslíku, může docházet k jeho oxidaci a vzniku uvedených oxidačních produktů s kratšími retenčními časy  $R_t$ , než jsou  $R_t$  samotného neoxidovaného limonenu. Rovněž Lewis a kol. [79, s. 757] ve své práci zmiňují, že limonen na vzduchu oxiduje, tvoří film a jeho oxidační chování je podobné jako u vysychavých olejů (např. lněný, konopný). Proto při další práci na této problematice bude potřebné rozšířit chromatografické stanovení o analýzu možných degradačních produktů limonenu, přítomných v jednotlivých frakcích kůže.

Další možný důvod nízké návratnosti limonenu může být spojen s charakteristickou vlastností esenciálních olejů a jejich složek, kterou je jejich těkavost. Je známo, že citronový olej, jehož součástí je limonen, patří k olejům, jež se rychle vypařují. Literární data uvádějí, že tenze par limonenu při 25 °C činí 264 Pa [80], což je hodnota výrazně vyšší ve srovnání s tenzí par např. cinnamaldehydu, která při stejné teplotě činí 3,853 Pa [81]. Lze tedy předpokládat, že i když je vzorek ve Franzově komůrce přikryt její donorovou částí, dochází během testu k odpaření části limonenu, což samozřejmě ovlivní jeho návratnost. Tuto skutečnost bude potřeba v další experimentální práci ověřit, zjistit množství vypařeného limonenu a případně provést test transdermální absorpce za podmínek okluze. Vzhledem k uvedeným skutečnostem je tedy zřejmé, že studii transdermální penetrace limonenu, představenou v diplomové práci, lze považovat za pilotní, bude ji nutno zopakovat a do vlastní metodiky testování i do analytické části (HPLC metoda) zahrnout všechny poznatky získané při zpracování této diplomové práce.

Z provedené literární studie bylo dále zjištěno, že limonen je v literatuře označován jako jeden z tzv. akcelerantů penetrace aktivních látek přes kožní bariéru. Tyto látky se využívají k usnadnění průniku aktivních látek (obvykle léčiv) přes kůži. Mechanismus jejich působení spočívá v reverzibilním snížení bariérové funkce kůže tím, že dezintegrují lipidové dvojvrstvy kůže a zvyšují tak jejich fluiditu. Méně rigidní struktura kůže je pak pro léčivo propustnější. Přestože je limonen k tomuto účelu často využíván, nejsou literární data o jeho transdermální absorpci častá. Ve větší míře se lze setkat s informacemi o penetraci konkrétních aktivních látek v jeho přítomnosti.

Penetraci D-limonenu, L-limonenu, jejich racemické směsi (a dalších terpenů) přes lidskou kůži se ve své práci zabývali Cal a kol. [82, s. 81]. Tyto látky byly inkorporovány do polymerní, polyuretanové matrice, která byla umístěna pod povrch kůže v difuzní komůrce. Jako receptorová kapalina sloužil dvoufázový systém složený z izotonického fosfátového pufru o pH 7,3 s přídatkem 5 ml metylenchloridu, doba trvání testu činila 8 h. Výsledky ukázaly, že D- a L-limonen penetrují přes kůži do receptorové kapaliny málo, a po 8 h bylo zjištěné množství limonenu v receptorové kapalině nižší, než  $0,5 \text{ mg cm}^{-2}$  kůže. Naopak racemická směs D a L limonenu penetrovala kůži mnohem lépe, a množství prošlé do receptorové kapaliny činilo ca  $2,2 \text{ mg cm}^{-2}$  kůže. Pro toto překvapivé zjištění neměli autoři článku žádné vysvětlení. V další publikaci [83, s. 826] studovali autoři nanoemulze D-limonenu stabilizované kombinací dvou surfaktantů, a to sorbitan trioleátu a polyoxyethylen (20) oleyl etheru. Bylo studováno více poměrů surfaktantů, které byly

zvoleny tak, aby hodnota hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB) ležela mezi 2 a 12. Transdermální penetrace byla testována *in vitro* pomocí Franzových difuzních komůrek s použitím kůže potkanů a jako receptorová kapalina byl použit hexan. Studie ukázala, že transdermální penetrace je významně ovlivněna velikostí emulzních kapek. Nejmenší kapky byly získány pro HLB = 12, kdy byla rovněž zaznamenána nejvyšší účinnost enkapsulace. Emulze s nejmenší velikostí kapek (54 nm) dosáhla maximální rychlosti permeace. Koncentrace D-limonenu v kůži po šesti hodinách (doba trvání testu) činila  $40 \mu\text{l cm}^{-2}$  kůže. Ani v jedné z publikací však nebyly uvedeny údaje o návratnosti aplikovaného limonenu.

#### **9.3.4 Transdermální absorpce eugenolu a jeho emulzí**

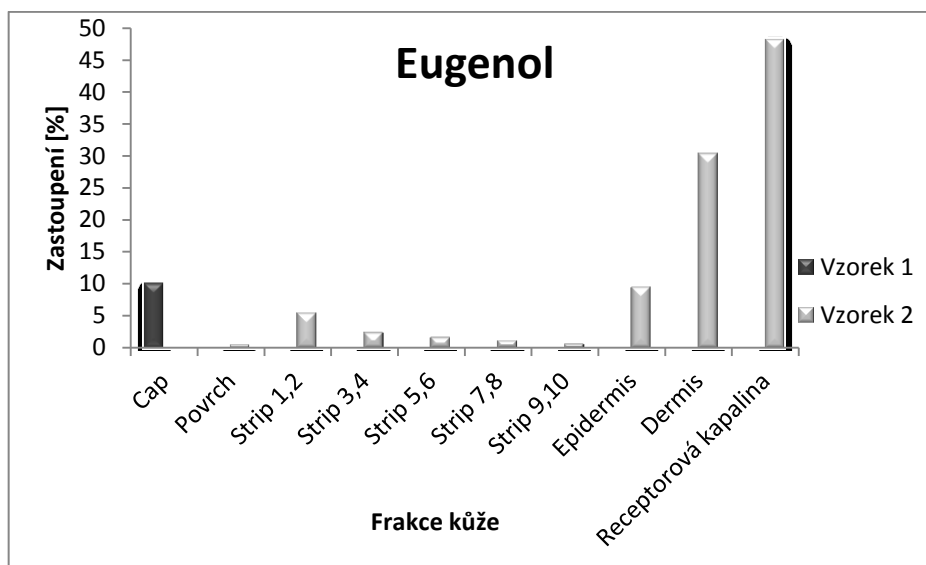
U samotného eugenolu i jeho emulzí byla transdermální absorpce testována ve dvou paralelních stanoveních a výsledné koncentrace včetně procentuálního zastoupení eugenolu v jednotlivých kožních vrstvách jsou uvedeny v Tab. 10 (samotný eugenol), v Tab. 11 (eugenol obsažený v emulzi stabilizované pomocí CNC), a v Tab. 12 (eugenol obsažený v emulzi stabilizované pomocí MFC).

Tab. 12: Koncentrace a procentuální zastoupení eugenolu (E) v jednotlivých frakcích kůže ( $n = 2$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Zastoupení [%]	
	E1	E2	E1	E2
Cap <sup>a)</sup>	128	0	10,1	0,0
Povrch	0	6	0,0	0,5
Strip 1,2	123	58	9,7	5,5
Strip 3,4	51	26	4,1	2,5
Strip 5,6	25	18	2,0	1,7
Strip 7,8	16	13	1,2	1,2
Strip 9,10	11	7	0,9	0,7
Epidermis	42	102	3,3	9,5
Dermis	340	323	26,8	30,3
Receptorová kapalina	531	513	41,9	48,1
Zbytek	549	473	---	---
<b>Celkové množství</b>	<b>1816</b>	<b>1539</b>	<b>100</b>	

<sup>a)</sup>Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky

Naměřené hodnoty ukazují, že samotný eugenol se téměř nevyskytoval v jednotlivých kožních frakcích, ale procházel až do dermis a receptorové kapaliny. Na Obr. 30 jsou znázorněny všechny kožní frakce včetně receptorové kapaliny a z těchto hodnot vyplývá, že největší množství eugenolu (mezi 40 až 50 % z celkového množství) se nacházelo až v receptorové kapalině. Menší množství eugenolu (kolem 30 %) bylo obsaženo v dermis. Celková návratnost eugenolu však byla nízká, pro E1 9 % a 8 % pro E2.



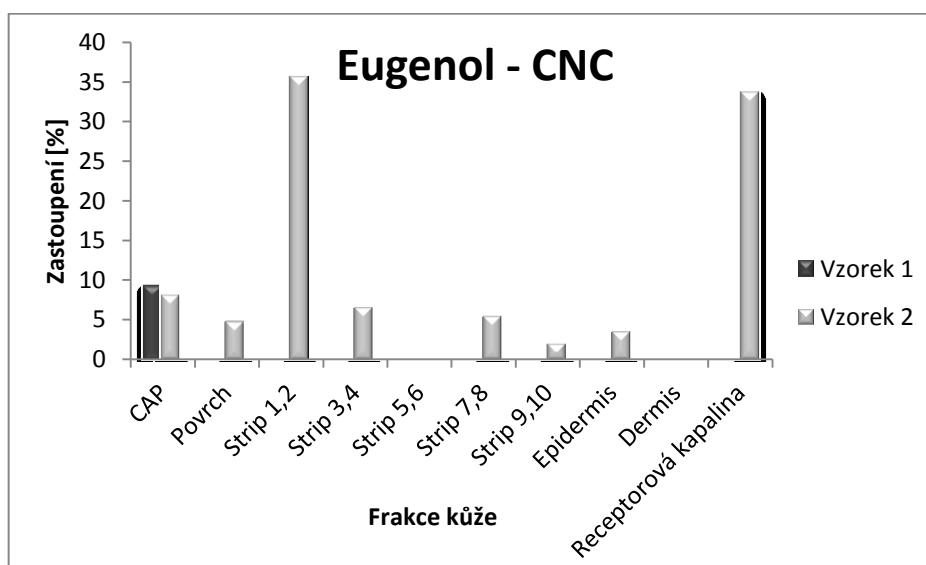
Obr. 30: Procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých kožních frakcích

U emulze stabilizované pomocí CNC (Tab. 13) už bylo rozložení eugenolu v jednotlivých kožních frakcích jiné, než u samotného eugenolu. Opět sice značné množství eugenolu prošlo až do receptorové kapaliny (Obr. 31), nicméně je patrné, že jeho vyšší množství se nacházelo i na povrchu kůže a v prvních dvou kožních stripech. Nejvyšší množství (více než 30 %) eugenolu pak bylo obsaženo v prvních dvou kožních stripech. V této souvislosti je rovněž třeba konstatovat, že pro analýzu obsahu eugenolu v jednotlivých vrstvách kůže po aplikaci emulzí stabilizovaných CNC, musela být použita jiná chromatografická soustava, než pro samotný olej. Mobilní fáze pro analýzu eugenolu v emulzích obsahovala acetonitril, pro samotný olej to byl methanol. Důvodem změny byla špatná separace eugenolu v mobilní fázi s methanolem. Navíc bylo pozorováno, že extrakt tohoto vzorku byl značně zakalen a musel být před nástřikem několikrát filtrován. Lze se tedy domnívat, že zde dochází k interakci eugenolu s kožním modelem, což vede ke znehodnocení vzorku, které může ovlivnit jak vlastní analýzu, tak výsledky HPLC stanovení. Co se týká celkové návratnosti aplikovaného eugenolu z emulze stabilizované pomocí CNC, tak byla vyšší než u samotného eugenolu, nicméně stále byla v obou případech nízká (20 % u E1<sub>CNC</sub> a 18 % u E2<sub>CNC</sub>).

Tab. 13: Koncentrace a procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované CNC ( $n = 2$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Zastoupení [%]	
	E1 <sub>CNC</sub>	E2 <sub>CNC</sub>	E1 <sub>CNC</sub>	E2 <sub>CNC</sub>
Cap <sup>a)</sup>	199	154	9,3	8,2
Povrch	411	91	19,2	4,9
Strip 1,2	663	666	31,0	35,5
Strip 3,4	125	124	5,8	6,6
Strip 5,6	0	0	0,0	0,0
Strip 7,8	93	104	4,4	5,5
Strip 9,10	92	38	4,3	2,1
Epidermis	96	68	4,5	3,6
Receptorová kapalina	459	630	21,5	33,6
<b>Celkové množství</b>	<b>2138</b>	<b>1875</b>	<b>100</b>	

<sup>a)</sup> Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky



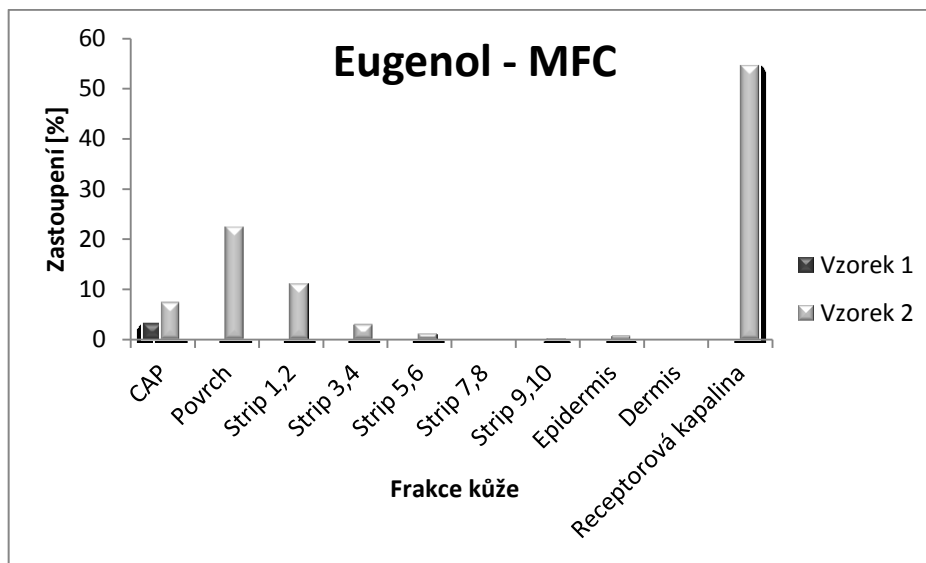
Obr. 31: Procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované CNC

Tab. 14: Koncentrace a procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované MFC ( $n = 2$ )

Frakce kůže	Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Zastoupení [%]	
	E1 <sub>MFC</sub>	E2 <sub>MFC</sub>	E1 <sub>MFC</sub>	E2 <sub>MFC</sub>
Cap <sup>a)</sup>	84	219	3,2	7,3
Povrch	706	670	26,7	22,4
Strip 1,2	279	329	10,5	11,0
Strip 3,4	105	87	4,0	2,9
Strip 5,6	46	32	1,7	1,1
Strip 7,8	29	0	1,1	0,0
Strip 9,10	16	5	0,6	0,2
Epidermis	48	19	1,8	0,6
Receptorová kapalina	1332	1629	50,4	54,5
<b>Celkové množství</b>	<b>2645</b>	<b>2990</b>	<b>100</b>	

<sup>a)</sup> Označení vzorku z donorové části Franzovy komůrky

Obdobně jako u předchozí emulze, ani v případě emulze stabilizované pomocí MFC nelze jednoznačně určit množství eugenolu obsaženého v dermis. Důvodem je opět vznikající zákal. Na Obr. 32 jsou opět zobrazena množství eugenolu v jednotlivých kožních vrstvách kůže, včetně receptorové kapaliny, v níž se eugenol nacházel v nejvyšší koncentraci. Vyšší množství eugenolu se nacházelo i na povrchu kůže a v dalších kožních vrstvách se jeho množství postupně snižovalo téměř na nulovou hodnotu ve stripech 9,10. Celková návratnost aplikovaného eugenolu byla i v případě této emulze poměrně nízká, 25 % pro E1<sub>MFC</sub> a 28 % pro E2<sub>MFC</sub>.



Obr. 32: Procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované MFC

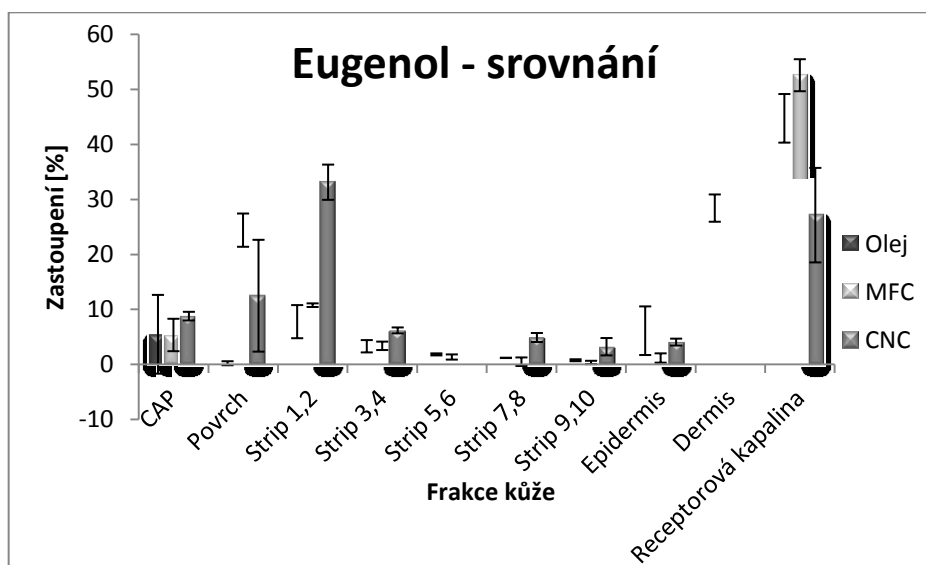
#### 9.3.4.1 Porovnání transdermální absorpce eugenolu

Při srovnání výsledků transdermální absorpce eugenolu ve sledovaných vzorcích je nutno opět zdůraznit výše uvedenou skutečnost, že pro HPLC samotného eugenolu a jeho emulzí byly použity odlišné chromatografické metody s odlišnými mobilními fázemi. Pro samotný esenciální olej byla použita mobilní fáze methanol : voda (v poměru 60 : 40), která však neposkytla uspokojivé výsledky při analýze emulzí. Bylo tedy provedeno opětovné přefiltrování vzorků emulzí, díky němuž došlo k vytvoření zákalu a pravděpodobnému vysrážení rozkladných produktů u vzorků obsahujících dermis a zbytky kůže po vystřížení vnitřního terčíku, a proto nemohly být tyto vzorky dále testovány. Pro analýzu emulzí byla tedy následně použita mobilní fáze ve složení acetonitril : voda (v poměru 50 : 50).

Pokud i přes uvedené potíže výsledky srovnáme, je patrné, že značné množství eugenolu při analýze samotného oleje prošlo do nejhlubších kožních vrstev, jak je zobrazeno na Obr. 33. Jeho nejvyšší množství se nacházelo v receptorové kapalině a značné množství bylo obsaženo i v dermis. I v případě obou typů emulzí se nejvyšší množství eugenolu nacházelo v receptorové kapalině. Z obrázku je patrné, že existuje rozdíl v chování i mezi eugenolem enkapsulovaným do emulzí stabilizovaných pomocí CNC a MFC. U emulze stabilizované pomocí CNC se nejvyšší množství eugenolu nacházelo na kožním povrchu a v prvních dvou kožních stripech (v obou frakcích dohromady kolem 50 % z celkového



množství), v dalších kožních vrstvách bylo množství eugenolu zanedbatelné. U emulze stabilizované pomocí MFC se nejvyšší množství eugenolu nacházelo na povrchu kůže a v dalších kožních stripech se jeho množství postupně snižovalo až k nule. Tuto skutečnost je možné vysvětlit rozdílným charakterem částic CNC a MFC. Stejně jako v případě cinnamaldehydu se lze domnívat, že delší vlákna MFC, která zůstávají na povrchu kožního vzorku, mohou tvořit ochrannou vrstvu bránící pronikání eugenolu do hlubších vrstev kůže.



Obr. 33: Srovnání množství eugenolu v kožních frakcích podle typu použitého vzorku

Vzhledem k získaným výsledkům lze tuto studii transdermální absorpce eugenolu i jeho emulzí stabilizovaných pomocí CNC a MFC považovat za úvodní. Nicméně, ze získaných dat lze stanovit doporučení pro další testování, jež se týká výběru vhodné mobilní fáze. Z testování vyplynulo, že pro samotný eugenol může být vhodnou mobilní fází směs methanolu s vodou (v poměru 60 : 40), která však není vhodná pro emulze. V případě emulzí se jevila lepší směs obsahující větší podíl vody (směs acetonitrilu s vodou v poměru 50 : 50). V případě dalšího testování by mohla být jako mobilní fáze použita buď směs jiných rozpouštědel, nebo stejných rozpouštědel ale v jiném poměru obou fází. Bude proto potřeba se věnovat více a podrobněji vývoji vhodné HPLC metody.

## 9.4 Cytotoxicita emulzí

Cytotoxické působení připravených emulzí bylo provedeno pomocí testu MTT. Pro testování byly zvoleny vzorky, které byly stabilizovány CNC a obsahovaly cinnamaldehyd ( $C_{CNC}$ ) a limonen ( $L_{CNC}$ ), tedy oleje s rozdílnou polaritou, a především s rozdílnou antibakteriální účinností, kdy emulze s cinnamaldehydem vykazovaly výrazně vyšší aktivitu než emulze obsahující limonen [73, s. 787]. Pro srovnání s emulzemi byla testována rovněž suspenze samotných CNC nanokrystalů.

Byly použity dvě buněčné linie, a to primární myší embryonální fibroblasty (MEF), a embryonální myší fibroblasty NIH/3T3. Množství životaschopných buněk po aplikaci emulzí bylo stanoveno změřením absorpance pomocí spektrofotometru. Hodnoty viability buněk jsou uvedeny v Tab. 15. Koncentrace, při kterých nevykazují testované vzorky cytotoxicitu, jsou označeny šedou barvou.

Ze získaných výsledků lze usuzovat, že samotná celulóza má na životaschopnost buněk pouze malý vliv, a to i při její vysoké koncentraci  $1\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$  v kultivačním médiu. Pouze na buňkách MEF, jež jsou obecně citlivější na environmentální faktory, bylo při této koncentraci zaznamenáno snížení viability a účinek suspenze krystalů celulózy byl klasifikován jako slabě cytotoxický. K ovlivnění životaschopnosti buněk dochází až při působení emulzí s obsahem limonenu a především cinnamaldehydu. Cinnamaldehyd významně snižuje životaschopnost buněk i při nízké koncentraci. V případě MEF tato koncentrace činí  $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$  (střední cytotoxicita) a v případě NIH/3T3  $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$  (silná cytotoxicita). Absence cytotoxické koncentrace cinnamaldehydu v emulzích pak nastává při  $1\ \mu\text{g ml}^{-1}$  pro MEF a  $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$  pro NIH/3T3. Emulze obsahující limonen pak ztrácejí svoji cytotoxicitu při koncentracích rovných a nižších než  $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$  pro MEF a  $500\ \mu\text{g ml}^{-1}$  pro NIH/3T3. Obecně lze proto konstatovat, že použití cinnamaldehydu v emulzích ovlivňuje životaschopnost buněk výrazně více, než použití limonenu. To je v souladu s výsledky antibakteriálních testů, provedených na uvedených emulzích a publikovaných Mikulcovou a kol. [73, s. 787], kdy antibakteriální aktivita emulzí s cinnamaldehydem vůči běžným gram pozitivním a gram negativním bakteriím byla výrazně vyšší, než u emulzí obsahujících limonen.

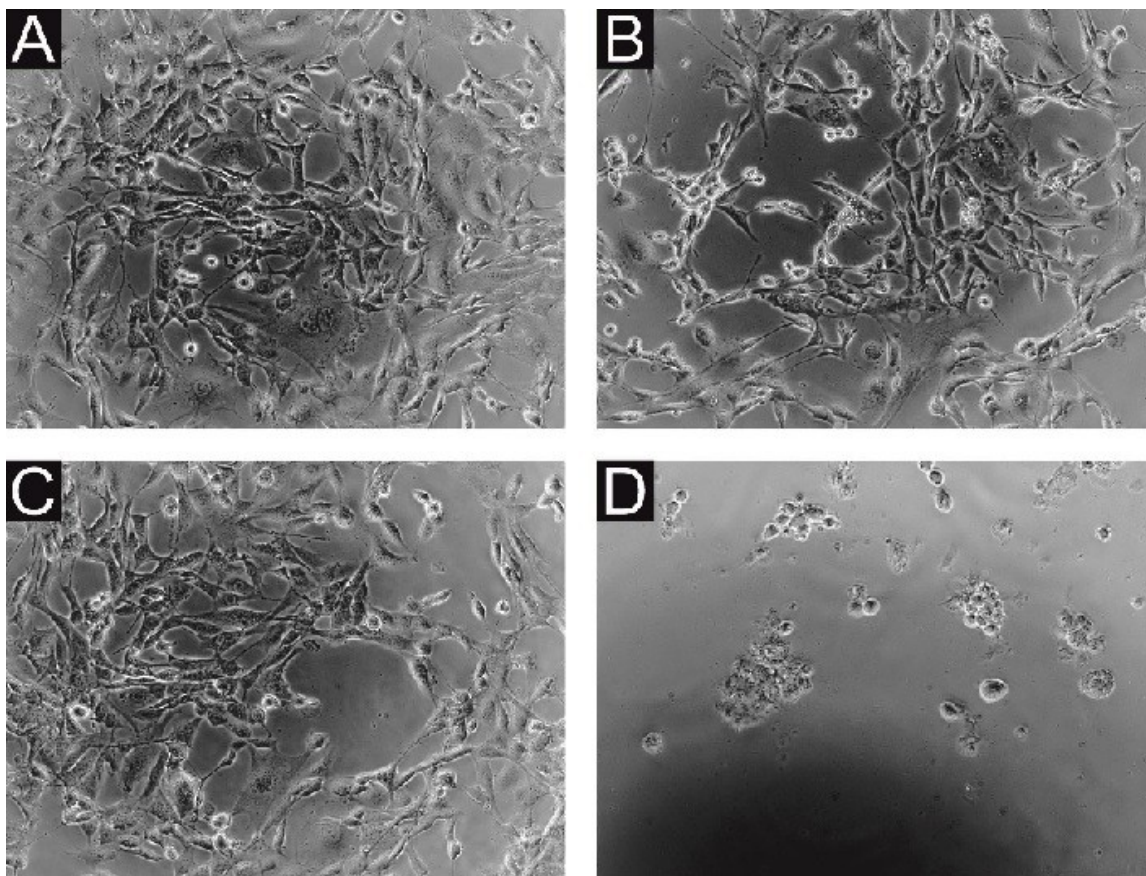
Tab. 15: Množství životaschopných buněk v jednotlivých buněčných liniích při testování cytotoxicity tří různých typů emulzí

Koncentrace celulózy/oleje v emulzi [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Množství životaschopných buněk [%]					
	CNC		$L_{\text{CNC}}$		$C_{\text{CNC}}$	
	MEF	NIH/3T3	MEF	NIH/3T3	MEF	NIH/3T3
<b>0,05</b>	131	99	93	110	103	103
<b>0,10</b>	122	89	100	110	99	96
<b>0,50</b>	118	90	109	108	98	95
<b>1</b>	117	89	92	101	84	91
<b>5</b>	114	92	99	105	46	88
<b>10</b>	115	90	97	106	31	69
<b>50</b>	109	91	90	103	0	25
<b>100</b>	99	88	78	97	0	2
<b>500</b>	91	86	74	98	0	4
<b>1 000</b>	63	80	66	74	0	2

*necytotoxický účinek = množství životaschopných buněk vyšší než 80 %; slabě cytotoxický účinek = množství životaschopných buněk 60 – 80 %; středně cytotoxický účinek = množství životaschopných buněk 40 – 60 %; silně cytotoxický účinek = množství životaschopných buněk menší než 40 %.*

Spolu s testem cytotoxicity byl rovněž hodnocen vzhled a morfologie buněk po aplikaci jak emulzí, tak i disperze celulózy. Na Obr. 34 jsou představeny mikrofotografie buněk kultivovaných po dobu 24 h v přítomnosti  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  celulózy (Obr. 34 B), emulze s limonenem (Obr. 34 C) a cinnamaldehydem (Obr. 34 D). I z těchto obrázků jsou patrné významné rozdíly v chování buněk. Je zřejmé, že morfologie buněk a jejich množství jsou srovnatelné mezi referencí, kterou byly buňky kultivované pouze v přítomnosti kultivačního média, a disperzí celulózy (Obr. 34 A). Při srovnání s referencí je rovněž pozorován malý rozdíl ve vzhledu a počtu buněk v případě emulze s limonenem, avšak velmi vý-

znamný rozdíl je patrný v případě emulze s cinnamaldehydem. Zde buňky ztrácejí svůj obvyklý tvar a jejich počet je oproti referenci výrazně snížen.



Obr. 34: Cytotoxicita vzorků při koncentraci  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . A) reference, B) disperze celulózy, C) emulze s limonenem, D) emulze s cinnamaldehydem; vše na buňkách MEF

## ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na testování transdermální absorpce připravených Pickeringových emulzí metodou *in vitro* s využitím Franzových difuzních komůrek. Jako absorpční membrána byla použita kůže z ušního boltce prasete a množství testovaných látek, obsažených v jednotlivých vrstvách kůže, bylo stanoveno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Byly testovány dva typy Pickeringových emulzí s obsahem bioaktivních lipofilních látek, kdy první typ byl stabilizován pomocí celulóзовých nanokrystalů, a ke stabilizaci druhého typu byla použita mikrofibrilární celulóza. V obou připravených emulzích byly přítomny bioaktivní lipofilní látky (složky esenciálních olejů) v množství 10 % a obsah celulózy tvořil 0,5 % hm. Kromě emulzí byla transdermální absorpce testována i u samotných složek esenciálních olejů, jimiž byl limonen, cinnamaldehyd a eugenol.

Bylo zjištěno, že prostup jednotlivých látek přes kožní vrstvy je různý pro samotné látky, a pro látky obsažené v Pickeringových emulzích. Z testování cinnamaldehydu vyplynulo, že nejvyšší množství samotného cinnamaldehydu zůstalo na povrchu donorové části Franzovy komůrky, a v dalších frakcích se jeho množství postupně snižovalo. V případě obou typů emulzí se jeho nejvyšší množství nacházelo na kožním povrchu, nicméně i mezi oběma emulzemi byl rozdíl. U emulze stabilizované pomocí MFC bylo množství cinnamaldehydu na povrchu kůže vyšší než u emulze stabilizované pomocí CNC, což lze vysvětlit rozdílným charakterem stabilizujících celulóзовých částic. Delší vlákna MFC mohou tvořit na povrchu kůže ochranný film, který brání průniku cinnamaldehydu do hlubších vrstev.

Při testování limonenu bylo zjištěno, že mezi samotným limonenem a jeho emulzemi nebyl výrazný rozdíl. Ve všech třech případech se limonen na povrchu téměř nevyskytoval, a nejvyšší množství bylo obsaženo až v hlubších kožních vrstvách. Samotný limonen byl nejvíce zastoupen v epidermis, zatímco limonen enkapsulovaný do obou typů emulzí byl nejvíce obsažen až v dermis. Problém nízké návratnosti, jež se objevil v souvislosti s testováním limonenu, byl dán do souvislosti s jeho možnou oxidací a tvorbou oxidačních produktů, vznikajících při delším časovém namáhání v přítomnosti vlhkosti a volného kyslíku. Nízká návratnost také mohla být způsobena odpařením limonenu i přesto, že byl vzorek při testu překryt donorovou částí Franzovy komůrky, která však není zcela uzavřena.

Z testování eugenolu bylo zjištěno, že ve všech třech případech jeho nejvyšší množství prošlo až do receptorové kapaliny. Samotný olej byl ve vyšším množství obsažen i v dermis, zatímco u emulzí bylo jeho vyšší množství hlavně na povrchu kůže. U emulze stabilizované pomocí CNC činilo množství obsažené na povrchu a v prvních dvou kožních stripech celkem 50 % z celkového množství, zatímco u emulze stabilizované pomocí MFC bylo nejvyšší množství na povrchu, a v dalších vrstvách se postupně snižovalo. Tuto skutečnost lze vysvětlit obdobně, jako v případě cinnamaldehydu, a to tak, že delší vlákna MFC tvoří na povrchu kůže ochranný film bránící prostupování eugenolu do hlubších kožních vrstev.

Výsledky práce však naznačily, že této problematice bude potřeba věnovat další pozornost, a to jak při návrhu samotného experimentu, tak při analytické práci a vývoji HPLC metody, konkrétně pro stanovení eugenolu.

Testy na MEF a NIH/3T3 buňkách ukázaly i rozdílnou cytotoxicitu připravených emulzí. Při srovnání emulze s obsahem cinnamaldehydu a limonenu bylo zjištěno, že použití cinnamaldehydu v emulzích ovlivňuje životaschopnost buněk výrazně více než použití limonenu, a to i při nízké koncentraci.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3*. 3. upravené a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, 2016, 832 s. ISBN 978-80-247-5636-3.
- [2] BOLZINGER, Marie-Alexandrine et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2012, **17**(3), s. 156-165. ISSN 13590294
- [3] KOTINGOVÁ, Lenka et al. Testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*. *Chemické listy: časopis pro průmysl chemický*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, **103**(7), s. 533-539. ISSN 0009-2770.
- [4] EHRHARDT, Carsten a Kwang-Jin KIM. *Drug absorption studies in situ, in vitro and in silico models*. New York: Springer, 2008, 695 s. ISBN 9780387749013.
- [5] VÁVROVÁ, Kateřina a Alexandr HRABÁLEK. Role ceramidů v kůži. *Praktické lékárenství* [online]. 2006, **2**, s. 55-58 [cit. 2016-11-17]. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/02/01.pdf>
- [6] VISSCHER, Marty a Vivek NARENDRAN. *Skin structure*. Fig. 1 [online]. 2014, **14**(4), s. 135-141 [cit. 2016-11-19]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1527336914000907>
- [7] EUROPEAN COMMISSION. *Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetics ingredients* [online]. Brussels: SCCP/0970/06, 2006, 12 s. [cit. 2017-01-11]. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_s\\_03.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf)
- [8] KIELHORN, Janet et al. *Dermal absorption*. Geneva: World Health Organization, 2006, 217 s. ISBN 9241572353.
- [9] PITTERMANN, Wolfgang. *Various skin penetration phases*. Fig. 1 b) [online]. Germany, 2000–2011 [cit. 2017-01-10]. Dostupné z: [http://www.gd-online.de/german/originals\\_d/originals\\_d\\_dr/Pittermann2000\\_e\\_dr.htm](http://www.gd-online.de/german/originals_d/originals_d_dr/Pittermann2000_e_dr.htm)
- [10] HRABÁLEK, Alexandr et al. Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické listy: časopis pro průmysl chemický*. Praha: Česká společnost chemická, 1999, **93**(2), s. 107-119.

- [11] BARTOŠOVÁ, Lucie a Jiří BAJGAR. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, **19**(27), s. 4671-4677. ISSN 09298673.
- [12] WILLIAMS, Adrian. *Transdermal and topical drug delivery: from theory to clinical practice*. London: Pharmaceutical Press, 2003. 242 s. ISBN 0853694893.
- [13] MITRAGOTRI, Samir. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *Journal of Controlled Release*. 2003, **86**(1), s. 69-92. ISSN 01683659.
- [14] COSTIGAN, S. C. et al. Estimations of lipid bilayer geometry in fluid lamellar phases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2000, **1468**(1-2), s. 41-54. ISSN 00052736.
- [15] HOLMGAARD, Rikke a Jesper Bo NIELSEN. *Pathways through the skin*. Fig. 3 [online]. 2009, **124**, s. 20 [cit. 2017-01-10]. Dostupné z: <http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2009/978-87-7052-980-8/pdf/978-87-7052-981-5.pdf>
- [16] DIEMBECK, Walter et al. Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients. *Food and Chemical Toxicology*. 1999, **37**(2-3), s. 191-205. ISSN 02786915.
- [17] SELZER, Dominik et al. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, **65**(2), s. 278-294. ISSN 0169409x.
- [18] VAN RAVENZWAAY, Bennard a E. LEIBOLD. The significance of in vitro rat skin absorption studies to human risk assessment. *Toxicology in Vitro*. 2004, **18**(2), s. 219-225. ISSN 08872333.
- [19] BENSON, Heather A. E. a Adam C. WATKINSON. *Transdermal and topical drug delivery: principles and practice*. Hoboken, N. J.: Wiley, ©2012. 242 s. ISBN 0470450290.
- [20] SINGH, Inderjeet a Andrew Phillip MORRIS. Performance of transdermal therapeutic systems: Effects of biological factors. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2011, **1**(1), s. 4-9. ISSN 2230-973x.



- [21] CROSS, Sheree a Michael ROBERTS. Dermal Blood Flow, Lymphatics, and Binding as Determinants of Topical Absorption, Clearance, and Distribution. In: RIVIERE, J. Edmond. *Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006, s. 251-281. Chapter 13. ISBN 0415700361.
- [22] JAKASA, Ivone et al. Percutaneous absorption of neat and aqueous solutions of 2-butoxyethanol in volunteers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 2004, **77**(2), s. 79-84. ISSN 0340-0131.
- [23] TSAI, Ming-Jun et al. *Modified Franz diffusion cell*. Fig. 1 [online]. Australia, 2014, [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102850>
- [24] PERMEGEAR. *In-Line Cells*. Fig. [online]. USA, 2015, [cit. 2017-02-08]. Dostupné z: <http://perme gear.com/in-line-cells/>
- [25] BRONAUGH, Robert L. *In Vitro Diffusion Cell Studies*. In: RIVIERE, J. Edmond. *Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006, s. 21-26. Chapter 2. ISBN 0415700361.
- [26] SEKKAT, N. et al. Biophysical Study of Porcine Ear Skin In Vitro and Its Comparison to Human Skin In Vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, **91**(11), s. 2376-2381. ISSN 00223549.
- [27] HERKENNE, Christophe et al. Pig Ear Skin ex Vivo as a Model for in Vivo Dermatopharmacokinetic Studies in Man. *Pharmaceutical Research*. 2006, **23**(8), s. 1850-1856. ISSN 0724-8741.
- [28] JACOBI, Ute et al. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology*. 2007, **13**(1), s. 19-24. ISSN 0909-752x.
- [29] NETZLAFF, Frank et al. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, **60**(2), s. 167-178. ISSN 09396411.
- [30] AHLSTROM, Liisa A. et al. The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2007, **30**(5), s. 456-463. ISSN 0140-7783.

- [31] DAVIES, Douglas J. et al. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicology in Vitro*. 2004, **18**(3), s. 351-358. ISSN 08872333.
- [32] KEZIC, Sanja a J. B. NIELSEN. Absorption of chemicals through compromised skin. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 2009, **82**(6), s. 677-688. ISSN 0340-0131.
- [33] MAGNUSSON, Beatrice M. et al. Molecular Size as the Main Determinant of Solute Maximum Flux Across the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2004, **122**(4), s. 993-999. ISSN 0022202x.
- [34] EVROPSKÁ UNIE. Nařízení Komise (ES) č. 440/2008 ze dne 30. května 2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. In: *Úřední věstník Evropské unie* [online]. 2008, 739 s. [cit. 2017-01-11]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32008R0440>
- [35] OECD. *Test Guideline 427: Skin absorption: in vivo Method* [online]. Paris: OECD, 2004, 8 s. [cit. 2017-01-11]. Dostupné z: [http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/environment/test-no-427-skin-absorption-in-vivo-method\\_9789264071063-en#.WHYB8n0gtRo#page6](http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/environment/test-no-427-skin-absorption-in-vivo-method_9789264071063-en#.WHYB8n0gtRo#page6)
- [36] HEYLINGS, Jon R. *Dermal penetration* [online]. Keele University, 2015 [cit. 2017-01-11]. Dostupné z: <http://alttox.org/mapp/toxicity-endpoints-tests/dermal-penetration/>
- [37] KUBINCOVÁ, Petra et al. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy: časopis pro průmysl chemický*. Praha: Česká společnost chemická, 2016, **110** (2), s. 118-125. ISSN 1213-7103.
- [38] FRESHNEY, R. Ian. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, ©2010, s. 365-382. Chapter 21. Cytotoxicity. ISBN 9780470528129.
- [39] LEWINSKI, Nastassja et al. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small*. 2008, **4**(1), s. 26-49. ISSN 16136810.

- [40] XIAO, Qin et al. A flounder (*Paralichthys olivaceus*) gill cell line as in vitro acute assay system of nonylphenol cytotoxicity. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2011, **175**(1-4), s. 315-319. ISSN 0167-6369.
- [41] MYBIOSOURCE. *Chemical Structures of Yellow MTT and Purple Formazan Product in Living Cells*. Fig. 1 [online]. © 2006–2017 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: [https://www.mybiosource.com/prods/Assay-Kit/CytoSelect-MTT-Cell-Proliferation-Assay/datasheet.php?products\\_id=168154](https://www.mybiosource.com/prods/Assay-Kit/CytoSelect-MTT-Cell-Proliferation-Assay/datasheet.php?products_id=168154)
- [42] EGNER, Pavlína. *Kosmetické technologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Distanční text.
- [43] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005 [cit. 2016-10-30]. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-001/ebook.help.htm](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/ebook.help.htm)
- [44] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 6. přeprac. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [45] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2001, 166 s. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-7318-016-2.
- [46] ALIAS, Abd K. *Emulsion Stability* [online]. Universiti Sains Malaysia, 2013 [cit. 2016-11-16]. Dostupné z: <http://www.slideshare.net/akarim717/emulsion-stability>
- [47] TU CLAUSTHAL. *Film formativ*. Fig. [online]. 2017 [cit. 2017-01-09]. Dostupné z: <https://www.pc.tu-clausthal.de/en/research/film-formation-from-latex-dispersions/>
- [48] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. 3. rozš. a přeprac. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 602 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [49] TADROS, Tharwat F. *Emulsion formation and stability*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2013, 272 s. ISBN 978-3-527-64797-2.
- [50] SKINOTO. *W/O/W emulsion*. Fig. [online]. 2015 [cit. 2016-11-16]. Dostupné z: <http://skinoto.com/japentech.html>
- [51] ZAJÍC, Jiří a Milan BAREŠ. *Chemie a technologie tuků*. Praha: MON, 1988, 244 s.

- [52] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 506 s. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [53] MALVERN INSTRUMENTS. *Zeta Potential – An Introduction in 30 Minutes* [online]. 2015 [cit. 2016-11-16]. Dostupné z: [https://caliscc.org/images/presentations/Morante\\_Zeta\\_Potential.pdf](https://caliscc.org/images/presentations/Morante_Zeta_Potential.pdf)
- [54] SHI, Jingyu. *Steric Stabilization* [online]. USA: Ohio State University, 2002 [cit. 2016-11-16]. Dostupné z: [http://muri.lci.kent.edu/References/NIM\\_Papers/stabilization\\_of\\_NP\\_suspensions/2002\\_Shi\\_steric\\_stabilization.pdf](http://muri.lci.kent.edu/References/NIM_Papers/stabilization_of_NP_suspensions/2002_Shi_steric_stabilization.pdf)
- [55] SCHRAMM, Laurier L. *Emulsions, foams, suspensions, and aerosols: microscience and applications*. 2nd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2014, 512 s. ISBN 978-3-527-67949-2.
- [56] SIMOVIC, S. et al. Pickering emulsions for dermal delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2011, **21**(1), s. 123-133. ISSN 17732247.
- [57] CHEVALIER, Yves a Marie-Alexandrine BOLZINGER. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, **439**, s. 23-34. ISSN 09277757.
- [58] MARTO, Joana et al. Starch-based Pickering emulsions for topical drug delivery: A QbD approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015, **135**, s. 183-192. ISSN 09277765.
- [59] CHEVALIER, Yves et al. Pickering Emulsions for Controlled Drug Delivery to the Skin. In: GRUMEZESCU, Alexandru. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015, s. 267-284. Chapter 19. ISBN 9783662450123.
- [60] TAVERNIER, Iris et al. Food-grade particles for emulsion stabilization. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, **50**, s. 159-174. ISSN 09242244.
- [61] GUNCHINBAT Dorjkhanda. *Emulsion and Pickering emulsion*. Fig. [online]. 2017 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <https://www.emaze.com/@AOQWFTWR/-seminar-class>
- [62] DAN, Nily R. Engineering Effective Nanoscale Nutrient Carriers. In: GRUMEZESCU, Alexandru. *Nutrient delivery: nanotechnology in the agri-food industry volume 5*. 2016, s. 141-168. Chapter 4. ISBN 9780128043042.

- [63] KHANARI, Klodian et al. Emulsions Stabilized by Microfibrillated Cellulose: The Effect of Hydrophobization, Concentration and O/W Ratio. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2011, **32**(3), s. 447-452. ISSN 0193-2691.
- [64] ZOPPE, Justin O. et al. Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, **369**(1), s. 202-209. ISSN 00219797.
- [65] CAPRON, Isabelle a Bernard CATHALA. Surfactant-Free High Internal Phase Emulsions Stabilized by Cellulose Nanocrystals. *Biomacromolecules*. 2013, **14**(2), s. 291-296. ISSN 1525-7797.
- [66] HU, Zhen et al. Surfactant-enhanced cellulose nanocrystal Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015, **439**, s. 139-148. ISSN 00219797.
- [67] HU, Zhen et al. *Schematic representation of a cellulose nanocrystal*. Fig. 1 [online]. 2015, **439**, s. 139-148 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/268748903\\_fig1\\_Fig-1-Schematic-representation-of-a-cellulose-nanocrystal-which-is-composed-of-high](https://www.researchgate.net/figure/268748903_fig1_Fig-1-Schematic-representation-of-a-cellulose-nanocrystal-which-is-composed-of-high)
- [68] PAXIMADA, Paraskevi et al. Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. *Food Hydrocolloids*. 2016, **53**, s. 225-232. ISSN 0268005x.
- [69] FRELICHOWSKA, Justyna et al. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, **371**(1-2), s. 56-63. ISSN 03785173.
- [70] MARKU, Diana et al. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, **428**(1-2), s. 1-7. ISSN 03785173.
- [71] HERMAN, Anna a Andrzej P. HERMAN. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015, **67**(4), s. 473-485. ISSN 00223573.
- [72] RHEE, Yun-Seok et al. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, **228**(1-2), s. 161-170. ISSN 03785173.
- [73] MIKULCOVÁ, Veronika et al. On the preparation and antibacterial activity of emulsions stabilized with nanocellulose particles. *Food Hydrocolloids*. 2016, **61**, s. 780-792. ISSN 0268005x.

- [74] MALVERN INSTRUMENTS LTD. Přetrvávající zájem o laserovou difrakci. *CHEMagazín: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi*. Pardubice: Ing. Miloslav Rotrekl, 2012, **22**(4), s. 8-10. ISSN 1210-7409.
- [75] ŠIMEK, Michal et al. Současné metody měření velikosti částic farmaceutických látek a jejich omezení. *Chemické listy: časopis pro průmysl chemický*. Praha: Česká společnost chemická, 2014, **108**(1), s. 50-55. ISSN 1213-7103.
- [76] SMITH, Camilla K. et al. Human Skin Absorption and Metabolism of the Contact Allergens, Cinnamic Aldehyde, and Cinnamic Alcohol. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000, **168**(3), s. 189-199. ISSN 0041008x.
- [77] BICKERS, D. et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*. 2005, **43**(6), s. 799-836. ISSN 02786915.
- [78] POKORNÝ, J. et al. Changes in the flavour of monoterpenes during their autooxidation under storage conditions. In: CONTIS, Ellene Tratras. *Food flavors: formation, analysis, and packaging influences : proceedings of the 9th International Flavor Conference, the George Charalambous Memorial Symposium, Limnos, Greece, 1-4 July 1997*. New York: Elsevier, 1998. s. 667-677. ISBN 978-0-444-82590-2.
- [79] RICHARD J. LEWIS a SR. *Hawley's condensed chemical dictionary*. 15h ed. Network version. New York, NY: Wiley-Interscience, 2007. ISBN 9780471768968.
- [80] YAWS, Carl L. *Handbook of Vapor Pressure*. Vol 3: Compounds [online]. Houston, TX: Gulf Pub Co, 1994 [cit. 2017-13-05]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/\\_\\_\\_-Limonene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/___-Limonene)
- [81] PERRY, Robert H. a Don W. GREEN. *Perry's chemical engineers' handbook*. Physical and Chemical data. 6th ed [online]. New York, NY: McGraw-Hill, 1984 [cit. 2017-13-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cinnamaldehyde>
- [82] CAL, Krzysztof et al. In vitro studies on penetration of terpenes from matrix-type transdermal systems through human skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, **224**(1-2), s. 81-88. ISSN 03785173.

- [83] LU, Wen-Chien et al. Skin permeation of d-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014, **21**(2), s. 826-832. ISSN 13504177.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BC	Bakteriální celulóza.
CNC	Celulózové nanokrystaly.
CNCs	Celulózové nanokrystaly.
Da	Dalton.
DAD	UV-VIS detektor s diodovým polem.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
GC	Plynová chromatografie.
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha.
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem.
MCC	Mikrokrystalická celulóza.
MCE	Methylcelulóza.
MEF	Myší embryonální fibroblasty.
MFC	Mikrofibrilární celulóza.
MK	Mastná kyselina.
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid.
NCC	Nanokrystalická celulóza.
O/V	Systém olej ve vodě.
PAL	Povrchově aktivní látka.
RNA	Ribonukleová kyselina.
SC	<i>Stratum corneum</i> .
SCCP	Vědecký výbor pro spotřební zboží (Scientific Committee on Consumer Products).
TER	Elektrický odpor kůže.
TEWL	Transepidermální ztráta vody.



- UV      Ultrafialové (z angl. ultraviolet).
- V/O      Systém voda v oleji.
- V/O/V    Systém voda v oleji ve vodě.
- WHO     Světová zdravotnická organizace (World Health Organization).

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Stavba epidermis [6, s. 135].....</i>	14
<i>Obr. 2: Transdermální prostup látek [9].....</i>	16
<i>Obr. 3: Cesty průniku látek [15, s. 20].....</i>	17
<i>Obr. 4: Franzova komůrka [23].....</i>	21
<i>Obr. 5: Průtoková vertikální difuzní komůrka [24].....</i>	21
<i>Obr. 6: Redukce MTT na formazan [41].....</i>	28
<i>Obr. 7: Emulze obrácená (vlevo) a přímá (vpravo) [46].....</i>	29
<i>Obr. 8: Emulze zředěná (a), koncentrovaná (b), gelovitá (c), upraveno dle [47].....</i>	30
<i>Obr. 9: Složená emulze typu V/O/V [50].....</i>	31
<i>Obr. 10: Rozdíl mezi klasickou a Pickeringovou emulzí [61].....</i>	35
<i>Obr. 11: Struktura CNC [67].....</i>	37
<i>Obr. 12: Oddělování vnitřní části boltce od chrupavky .....</i>	48
<i>Obr. 13: Oddělená kůže o plné tloušťce (vpravo).....</i>	49
<i>Obr. 14: Testovací aparatura propojených Franzových komůrek .....</i>	50
<i>Obr. 15: Vystřížení vnitřního terčíku kůže (vlevo) a puchýř epidermis (vpravo) .....</i>	51
<i>Obr. 16: Emulze stabilizované CNC, zleva cinnamaldehyd, limonen a eugenol.....</i>	54
<i>Obr. 17: Emulze stabilizované MFC, zleva cinnamaldehyd, limonen a eugenol .....</i>	55
<i>Obr. 18: Srovnání distribučních křivek emulzí stabilizovaných MFC a CNC obsahujících cinnamaldehyd .....</i>	57
<i>Obr. 19: Srovnání distribučních křivek emulzí stabilizovaných MFC a CNC obsahujících limonen.....</i>	57
<i>Obr. 20: Srovnání distribučních křivek emulzí stabilizovaných MFC a CNC obsahujících eugenol .....</i>	57
<i>Obr. 21: Kalibrační přímka eugenolu .....</i>	58
<i>Obr. 22: Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních frakcích.....</i>	61
<i>Obr. 23: Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované CNC .....</i>	63
<i>Obr. 24: Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované MFC .....</i>	65
<i>Obr. 25: Srovnání množství cinnamaldehydu v kožních frakcích podle typu použitého vzorku .....</i>	66
<i>Obr. 26: Procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých kožních frakcích.....</i>	68

<i>Obr. 27: Procentuální zastoupení limonenu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované CNC</i> .....	70
<i>Obr. 28: Procentuální zastoupení limonenu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci z emulze stabilizované MFC</i> .....	72
<i>Obr. 29: Srovnání množství limonenu v kožních frakcích podle typu použitého vzorku</i> .....	73
<i>Obr. 30: Procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých kožních frakcích</i> .....	77
<i>Obr. 31: Procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované CNC</i> .....	78
<i>Obr. 32: Procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých kožních frakcích po aplikaci emulze stabilizované MFC</i> .....	80
<i>Obr. 33: Srovnání množství eugenolu v kožních frakcích podle typu použitého vzorku</i> .....	81
<i>Obr. 34: Cytotoxicita vzorků při koncentraci 100 <math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>. A) reference, B) disperze celulózy, C) emulze s limonenem, D) emulze s cinnamaldehydem; vše na buňkách MEF</i> .....	84

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1: Charakteristiky použitých olejů.....</i>	46
<i>Tab. 2: Rozmezí koncentrací kalibračních standardů jednotlivých látek.....</i>	52
<i>Tab. 3: Parametry HPLC analýzy pro jednotlivé látky .....</i>	52
<i>Tab. 4: Hodnoty velikostí částic D[4;3] jednotlivých emulzí stanovené laserovou difrakcí (olejová fáze: C = cinnamaldehyd, L = limonen, E = eugenol).....</i>	55
<i>Tab. 5: Rovnice kalibračních přímek pro jednotlivé testované látky .....</i>	58
<i>Tab. 6: Koncentrace a procentuální zastoupení cinnamaldehydu (C) v jednotlivých frakcích kůže (n = 3) .....</i>	60
<i>Tab. 7: Koncentrace a procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované CNC (n = 3) .....</i>	62
<i>Tab. 8: Koncentrace a procentuální zastoupení cinnamaldehydu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované MFC (n = 3).....</i>	64
<i>Tab. 9: Koncentrace a procentuální zastoupení limonenu (L) v jednotlivých frakcích kůže (n = 2).....</i>	67
<i>Tab. 10: Koncentrace a procentuální zastoupení limonenu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované CNC (n = 3) .....</i>	69
<i>Tab. 11: Koncentrace a procentuální zastoupení limonenu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované MFC (n = 3).....</i>	71
<i>Tab. 12: Koncentrace a procentuální zastoupení eugenolu (E) v jednotlivých frakcích kůže (n = 2).....</i>	76
<i>Tab. 13: Koncentrace a procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované CNC (n = 2) .....</i>	78
<i>Tab. 14: Koncentrace a procentuální zastoupení eugenolu v jednotlivých frakcích kůže po aplikaci emulze stabilizované MFC (n = 2) .....</i>	79
<i>Tab. 15: Množství životaschopných buněk v jednotlivých buněčných liniích při testování cytotoxicity tří různých typů emulzí .....</i>	83