

ZKOUŠKA IN VITRO PENETRACE KŮŽE I.

Výsledek č. TH03010279 – V1

Číslo projektu: **TH03010279**

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

1. Účel

Zajistit standardní postup při provádění testu Kožní penetrace – *in vitro*.

2. Definice, zkratky

Nejsou

3. Textová část

Text tohoto SOP byl vypracován v souladu s normou:

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

3.1. Úvod

Tento SOP byl vypracován na základě metodiky. Hlavním zdrojem byla metodika OECD 428 Skin absorption: in vitro Method, Adopted 13 April 2004.

3.2. Princip metody

Testovaná látka označená vhodným radioaktivním zářičem je aplikována na povrch kůže oddělující dvě komory difusní komůrky. Takto označená chemická látka označená zůstává na kůži určitou dobu za stanovených podmínek. Za stanovených podmínek (teplota, vlhkost) označená testovaná látka penetruje skrz kůži do receptorové tekutiny. Receptorová tekutina je vzorkována ve vhodných časových intervalech během experimentu a analyzována na obsah testované látky nebo jejích metabolitů scintilační metodou.

3.2 Provedení studie

3.2.1 Použitý materiál

Kožní preparáty ze zvířecích zdrojů – nespářená kůže ze zadní strany ušních boltců nebo z boků prasat, určených k porážce na jatkách. Kůže musí být čistá, tj. bez poškození a tetování. Pro test je používána celá kůže (všechny vrstvy). Tloušťka kůže musí splňovat podmínku na tloušťku: > 1 mm.

Materiál je zajištěn z jatek TORO a.s. Hlavečnick.

3.2.2 Odběr a přeprava kůží do laboratoře

Ušní boltce, kůže z boků je odborně oddělena pracovníkem jatek a v tentýž den dopravena do laboratoře, kde je okamžitě zpracována. Kůže musí být nespářená.

3.2.3 Uchování kůží

Po prevozu do laboratoře je kůže opatrně omyta vodou a tekutým mýdlem. Následně je kůže očištěna od případných štětín (holením), je opatrně odpreparován podkožní tuk. Vypreparovaná kůže je důkladně prohlédnuta pod lupou a prosvícena, poškozená kůže je vyřazena.

K samotnému testu může být použita kůže bezprostředně po očištění a prohlédnutí nebo může být uchována v mrazicím boxu pro další použití. V případě zamražení je před samotným testem kůže rozmrazena a jsou z ní připraveny kožní terčíky.

3.2.4 Potřebný počet kožních preparátů

V testu musí být použita více než jedna koncentrace, které zahrnují maximální potenciální expozice člověka. V každé koncentraci musí být nejméně čtyři kožní preparáty. Každý kožní preparát musí být mikroskopicky kontrolován pro celistvost samostatně, před každým testem.

3.2.5 Experimentální provedení

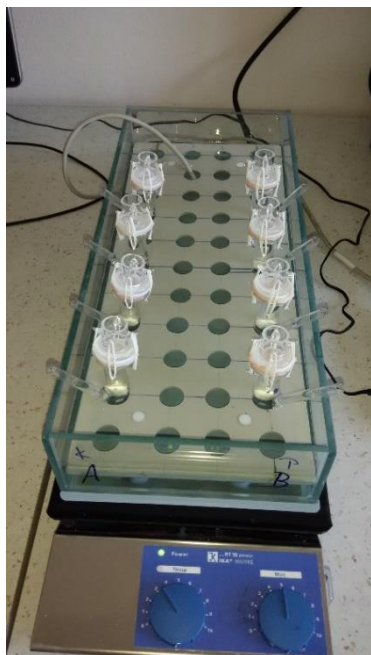
Aparatura

Pomůcky

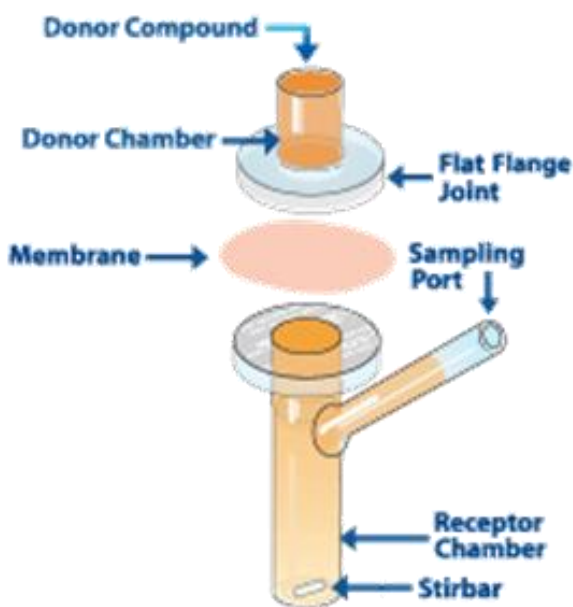
Ohřívací magnetická deska (10 míst)
Vodní lázeň s držákem difuzních komůrek
Difuzní komůrky
Malá míchadla
Teflonové podložky k držákům
Gumičky
Pinzety, nůžky, skalpel
Lupa se světlem
Jehly pro odběry vzorku, stříkačky

Na ohřívací magnetickou desku se umístí vodní lázeň (skleněné akvárium, rozměr odpovídá velikosti magnetické desky, výška akvária cca 4 cm). Do vodní lázně se umístí plastový držák na Difuzní komůrky. Lázeň se naplní vodou a umístí se do ní sonda pro měření teploty (záznamový teploměr Commeter). Do každé Difuzní komůrky se vloží malé míchadlo a komůrka se umístí do držáku. Při umístění komůrek do držáku je potřeba dbát, aby míchadélka vykonávala rotační pohyb. Do každé komůrky se vloží dlouhá jehla, které je pak součástí komůrky a provádějí se s ní jednotlivé odběry.

Obrázek č. 1 – Aparatura



Obrázek č. 2 – Difuzní komůrka



Příprava před testováním

Z kůže jsou vyříznuta kolečka o průměru cca: 4 cm, tak aby pokryla celý povrch Difuzní komůrky. Proveďte kontrolu tloušťky kůže, použita je pouze kůže, splňující podmínku: tloušťka: > 1 mm. Kolečka (kožní preparáty) jsou upevněny do předem připravených Francisových komůrek s receptorovou tekutinou a malými míchadly (viz aparatura).

Na spodní část Difuzní komůrky se přiloží teflonový kroužek (brání poškození kůže), dále se přiloží kůže spodní vrstvou, na povrch kůže přiložíme další teflonové kolečko a nakonec přidáme víčko Difuzní komůrky. Kůži v komůrce zafixujeme gumičkami po stranách Difuzní komůrky. Difuzní komůrky jsou umístěny do vodní lázně do držáku komůrek ($32 \pm 1^\circ\text{C}$).

Každá komůrka má objem 10 ml, ve vybraných časových intervalech (záleží na vlastnostech testované látky) je pak odebírán 1 ml receptorová tekutiny pro měření. Vždy je dbáno, aby v systému nebyli vzduchové bubliny. Přítomnost vzduchových bublin způsobuje vysychání kožních preparátů a tím změnu jejich propustnosti.

Receptorová tekutina

Jako receptorová tekutina pro testování se nejčastěji používá fyziologický roztok. U lipofilních látek se přidává do receptorové tekutiny hovězí sérový albumin (5%), který rozpustnost ve vodném roztoku

T A Č R

podporuje. Použití jiné tekutiny musí být ověřeno a zdůvodněno. Množství receptorová tekutiny v komůrce je 10 ml.

Záznamy o použité receptorové kapalině jsou provedeny do protokolu podle Přílohy 2 tohoto SOP.

Aplikace testované látky

Testovaná radioaktivně označená látka se aplikuje v množství, které imituje expozici člověka (tj. 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ pro kapaliny nebo 1-5 mg/cm^2 pro pevné látky). Aplikace testovaných látek je prováděna na vrchní část kožního preparátu, do víčka Difuzní komůrky.

Expozice

Doba expozice může trvat 24 hodin, nebo může být zkrácena (podle expozice pro člověka). Frekvence odběrů receptorová tekutiny by měla umožnit grafickou prezentaci rychlosti průniku kůží – záleží na vlastnostech látky.

Po ukončení expozice se provede oplach kůží, pomocí stříčky a tento oplach kožních preparátů se dále analyzuje stejným způsobem, jako receptorová tekutina jednotlivých odběrů.

Odběry pro analýzu

Jednotlivé odběry pro analýzu jsou prováděny na základě vlastností testované látky. Pokud jsou známy penetrační vlastnosti testované látky, postaví se na těchto informacích časové schéma jednotlivých odběrů. K zjištění časového schéma může být proveden předtest s jednou koncentrací a čtyřmi kožními preparáty. Na základě tohoto předtestu se získá přesnější časové schéma. Průběh předtestu je shodný jako samotný test.

V těchto jednotlivých časových intervalech je pak proveden odběr 1 ml receptorové tekutiny pro vlastní analýzu. Do systému je vrácena čistá receptorová tekutina (1 ml – celkový objem 10 ml receptorové tekutiny musí být po celou dobu provedení testu). Při odběru a následném doplnění je dbáno, aby v systému nezůstala žádná vzduchová bublina, která by způsobila vysoušení kůže a tím porušení jejich penetračních vlastností.

Příprava pro analýzu

Odebraný 1ml receptorové tekutiny je převeden do plastové scintilační lahvičky s 9 ml scintilačního roztoku TRITON. Jednotlivé lahvičky se na horní části víčka označí zvoleným kódem pro testovanou látku a časovým intervalem, např.: testovaná látka Kofein, časový interval 1 hodina: K/1H. Poté se lahvičky umístí do držáků scintilačního přístroje a provede se samotná analýza.

Roztok TRITON (scintilační roztok):

Roztok je připravován podle následujícího postupu, smícháním příslušného množství jednotlivých složek

<u>TRITON X-100 purris</u> (CAS: 9002-93-1)	1 díl
<u>SLT 41</u>	2 díly

T A Č R

Takto připravený roztok se za občasného promíchání nechá stát 24 hodin. Poté je připraven k použití.
Expirace: 1 rok od přípravy roztoku

TRITON X-100 purris

CAS: 9002-93-1
Dodavatel: Sigma-Aldrich
Vzhled: Bezbarvá čirá kapalina
Skladování: Laboratorní podmínky

Analýza

Analýza probíhá na kapalném scintilačním přístroji, Beckman LS 6500, SOP 194

Kapalný scintilátor Beckman LS 6500 je určen pro měření aktivity vzorků s nuklidy, emitujícími beta (volitelně) alfa záření. Přístroj se skládá z detektoru, měniče vzorků a řídicího počítače. Měřicí komora je stíněna olovem, obsahuje reflexní komůrku a dvojici fotonásobičů. Vyhodnovací části jsou pro uživatele nepřístupné. Vzorky se umísťují do prostoru měniče ve standardizovaných kazetách, ve vialkách, v kapalném scintilátoru (TRITON X-100).

Stanovení aktivity se provádí standardní metodou určení účinnosti detekce pomocí Horrocksova čísla H. Výstupní jednotkou jsou pak rozpady za minutu – dpm, přepočten na jednotky Bq je dělení koeficientem 60. Hodnoty jsou dále převedeny na MBq.

Na konci analýzy by mělo být získáno $100 \pm 10\%$ radioaktivity označené testované látky.

4. Literatura

Method OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Skin Absorption: in vitro Method No. 428, Adopted 13th April 2004

Method EU - B. 45 Skin Absorption: *in vitro* Method, Adopted 31st May 2008, Council Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)